

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Victoria Matsakyanová**

**Dvojitý vliv mezenchymálních kmenových buněk na nádorové bujení – jeho potlačení nebo podpora?**

**Dual effect of mesenchymal stem cells on cancer: its suppression or progression?**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D.

Praha, 2020

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 12. 8. 2020

Victoria Matsakyanová

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala mojí školitelce, paní doc. RNDr. Marii Hubálek Kalbáčové, Ph.D., za cenné rady a pomoc a za možnost vypracování mojí bakalářské práce pod jejím vedením. Dále také paní Mgr. Pavle Sauerové, Ph.D. za odborný dohled, trpělivost a ochotu v průběhu celého vypracování. Na závěr bych ráda poděkovala svojí rodině a partnerovi, kteří mě podporovali nejen v průběhu psaní práce, ale také během celého mého studia.

## ABSTRAKT

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) jsou multipotentní buňky nehematopoetického charakteru schopné diferencovat do osteogenního, adipogenního a chondrogenního buněčného typu a které lze tradičně izolovat například z kostní dřeně, tukové tkáně nebo pupeční šňůry. Pro své diferenciační, trofické a imunomodulační vlastnosti a schopnosti samovolně migrovat do místa zánětu, poškozené tkáně či nádorového mikroprostředí mají MSC velký potenciál stát se nejen nástrojem pro podporu reparace a regenerace tkání, ale také pro využití v protinádorových terapiích. Jejich potenciál je dále podpořen možností genetických manipulací, které mohou že zesílit jejich protinádorový účinek. Účinek MSC v kontextu nádorového bujení však není zcela jednoznačný. Zatímco v některých případech MSC vykazují protinádorové účinky, v jiných případech naopak k rozvoji nádorového bujení přispívají. Tento dvojitý vliv MSC na nádorové bujení je výsledkem působení mnoha faktorů modulujících vzájemnou interakci mezi MSC a nádorovými buňkami. Tato práce shrnuje současné znalosti o dvojitým vlivu MSC na nádorové bujení a demonstruje možné faktory, které mohou být za nejednoznačný vliv MSC zodpovědné.

**Klíčová slova:** mezenchymální kmenové buňky, nádorové bujení, nádorový tropismus, potlačení nádorového bujení, podpora nádorového bujení

## **ABSTRACT**

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent non-hematopoietic cells, capable of differentiation into osteogenic, adipogenic and chondrogenic cell types and can be isolated from bone marrow, adipose tissue or umbilical cord. Due to their differentiation, trophic and immunomodulatory properties, and also their ability to migrate spontaneously to the site of inflammation, damaged tissue or tumor microenvironment, MSCs bring a great potential to become not only a tool to support tissue repair and regeneration, but also for anticancer therapy. Their potential can be also supported by genetic manipulations, which may enhance their antitumor effect. However, in the context of tumor growth, the effect of MSCs is not so clear. While in some cases, MSCs play antitumorigenic role, in other cases they contribute to the development of tumor growth. This dual effect of MSCs on tumor growth is the result of many factors, which modulate the interaction between MSCs and tumor cells. This thesis summarizes the current knowledge of the dual effect of MSC on tumor cells and demonstrates the most promising factors that play the role in the dual effect of MSC.

**Key words:** mesenchymal stem cells, cancer, tumor tropism, cancer suppression, cancer progression

## SEZNAM ZKRATEK

<b>AD</b>	adipose tissue	tuková tkáň
<b>ALT</b>	alternative lengthening of telomeres	alternativní prodlužování telomer
<b>ASC</b>	adult stem cells	dospělé či somatické kmenové buňky
<b>BCP-ALL</b>	B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia	akutní lymfoblastická leukémie z prekursorů B-buněk
<b>bFGF</b>	basic fibroblast growth factor	základní fibroblastový růstový faktor
<b>BM</b>	bone marrow	kostní dřeň
<b>BM-MS</b>	bone marrow-derived MSC	MSC odvozené z kostní dřeně
<b>CAF</b>	cancer – associated fibroblasts	fibroblasty asociované s rakovinou
<b>CA-hMSC</b>	carcinoma associated human MSC	lidské MSC asociované s karcinomem
<b>cAMP</b>	cyclic adenosine monophosphate	cyklický adenosinmonofosfát
<b>CD</b>	cluster of differentiation	diferenciační antigen
<b>CDK</b>	cyclin-dependent kinase	cyklin-dependentní kináza
<b>CFU-Fs</b>	colony-forming units fibroblasts	jednotky buněk tvořící kolonie
<b>CM</b>	conditioned medium	kondiciované médium
<b>CML</b>	chronic myeloid leukemia	chronická myeloidní leukémie
<b>CRC</b>	colorectal carcinoma	kolorektální karcinom
<b>CSC</b>	cancer stem cells	nádorové kmenové buňky
<b>Cx43</b>	connexin 43	konexin 43
<b>DC</b>	dendritic cells	dendritické buňky
<b>DKK-1</b>	dickkopf-1 protein	dickkopf-1 protein
<b>EC</b>	endothelial cells	endoteliální buňky
<b>ECa</b>	endometrial carcinoma	karcinom endometria
<b>ECM</b>	extracellular matrix	extracelulární matrix

<b>EGF</b>	endothelial growth factor	endoteliální růstový faktor
<b>EMT</b>	epithelial–mesenchymal transition	epiteliálně–mezenchymální přechod
<b>ESC</b>	embryonic stem cells	embryonální kmenové buňky
<b>EV</b>	extracellular vesicles	extracelulární váčky
<b>FAP</b>	fibroblast activation protein	aktivační protein fibroblastů
<b>FGF</b>	fibroblast growth factor	fibroblastový růstový faktor
<b>FN</b>	fibronectin	fibronektin
<b>FSC</b>	fetal stem cells	fetální kmenové buňky
<b>GA-hMSC</b>	glioma associated human MSC	lidské MSC asociované s gliomem
<b>GBM</b>	glioblastoma multiforme	multiformní glioblastom
<b>GC</b>	gastric cancer	rakovina žaludku
<b>GC-MSC</b>	gastric cancer-derived MSC	lidské MSC odvozené z nádorové tkáně rakoviny žaludku
<b>GCN-MSC</b>	gastric cancer adjacent non-cancerous tissue-derived MSC	lidské MSC odvozené ze sousedící nenádorové tkáně
<b>GSC</b>	glioma stem cells	gliomové kmenové buňky
<b>hAD-MSC</b>	human adipose tissue-derived MSC	lidské MSC odvozené z tukové tkáně
<b>hBM-MSC</b>	human bone marrow-derived MSC	lidské MSC odvozené z kostní dřeně
<b>HCC</b>	hepatocellular carcinoma	hepatocelulární karcinom
<b>HDGF</b>	hepatoma-derived growth factor	růstový faktor odvozený z hepatomu
<b>HIF</b>	hypoxia-inducible factor	hypoxií indukovaný faktor
<b>HLA</b>	human leukocyte antigen	hlavní lidský (histokompatibilní) antigen
<b>hMSC</b>	human mesenchymal stem cells	lidské mezenchymální kmenové buňky
<b>HNF4<math>\alpha</math></b>	hepatocyte nuclear factor 4 alpha	hepatocytární jaderný faktor 4 alfa
<b>hPD-MSC</b>	human pancreatic ductal tissue-derived MSC	lidské MSC odvozené z pankreatické duktální tkáně
<b>hpMSC</b>	human placenta-derived MSC	lidské MSC odvozené z placenty

<b>hTERT</b>	telomerase reverse transcriptase	telomerázová reverzní transkriptáza
<b>hUC-MSC</b>	human umbilical cord-derived MSC	lidské MSC odvozené z pupeční šňůry
<b>IDO</b>	indoleamine 2,3-dioxygenase	indolamin 2,3-dioxygenáza
<b>IFN</b>	interferon	interferon
<b>IGF</b>	insulin growth factor	inzulínový růstový faktor
<b>IL</b>	interleukin	interleukin
<b>iPSC</b>	induced pluripotent stem cells	indukované pluripotentní kmenové buňky
<b>KGF</b>	keratinocyte growth factor	růstový faktor keratinocytů
<b>LRP</b>	lung resistance-related protein	protein související s lékovou rezistencí plic
<b>mBM-MSC</b>	mouse bone marrow-derived MSC	myší MSC odvozené z kostní dřeně
<b>MCP</b>	monocyte chemotactic protein	monocytový chemotaktický protein
<b>MET</b>	mesenchymal–epithelial transition	mezenchymálně–epiteliální přechod
<b>MHC II</b>	major histocompatibility complex II	hlavní histokompatibilní komplex tř. II
<b>MIP</b>	macrophage inflammatory protein	makrofágový zánětlivý protein
<b>miR</b>	microRNA	mikroRNA
<b>MMP</b>	matrix metalloproteinases	matrixové metaloproteinázy
<b>MRP</b>	multidrug resistance protein	protein mnohočetné lékové rezistence
<b>MSC</b>	mesenchymal stem/stromal cells	mezenchymální kmenové/stromální buňky
<b>NK</b>	natural killer	přirozený zabíječ
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	polymerázová řetězcová reakce
<b>PEDF</b>	pigment epithelium-derived factor	faktor odvozený z pigmentového epitelu
<b>PGE2</b>	prostaglandin E2	prostaglandin E2
<b>PKA</b>	protein kinase A	protein kináza A
<b>PTEN</b>	phosphatase and tensin homolog	homolog fosfatázy a tenzinu



<b>qRT-PCR</b>	quantitative reverse transcription	kvantitativní PCR reverzní transkripce
<b>RB gen/ protein</b>	retinoblastoma gene/protein	retinoblastomový gen/protein
<b>ROS</b>	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
<b>RTK</b>	receptor tyrosine kinase	tyrosinkinázový receptor
<b>SDF-1</b>	stromal cell-derived factor 1	faktor 1 odvozený ze stromálních buněk
<b>sFLT-1</b>	soluble fms-like tyrosine kinase-1	solubilní fms podobná tyrosinkináza 1
<b>SFRP2</b>	secreted frizzled-related protein 2	sekretovaný frizzled-příbuzný protein 2
<b>SPARC</b>	secreted protein acidic and rich in cysteine	sekretovaný kyselý protein bohatý na cystein; známý též jako osteonektin
<b>STC-1</b>	stanniocalcin-1	
<b>TAF</b>	tumor – associated fibroblasts	fibroblasty asociované s nádorem
<b>TGF</b>	transforming growth factor	transformující růstový faktor
<b>TIC</b>	tumor – initiating cells	tumor – iniciační buňky
<b>TIMP</b>	tissue inhibitor of metalloproteinase	tkáňový inhibitor metaloproteináz
<b>TLR</b>	toll-like receptors	receptory skupiny toll
<b>TNF</b>	tumor necrosis factor	faktor způsobující nekrózu nádorů
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis-inducing ligand	apoptózu indukující ligand příbuzný TNF
<b>UC</b>	umbilical cord	pupeční šňůra
<b>uPA</b>	urokinase-type plasminogen activator	aktivátor plasminogenu typu urokinázy
<b>VCAM</b>	vascular cell adhesion molecule	cévní adhezivní molekula
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor	vaskulární endoteliální růstový faktor
<b>VE- cadherin</b>	vascular endothelial cadherin	vaskulární endoteliální kadherin
<b>vWF</b>	von Willebrand factor	von Willebrandův faktor
<b>Wnt</b>	Wingless-INT signaling pathway	Wnt signalizační kaskáda
<b>XIAP</b>	X-linked inhibitor of apoptosis	X-vázaný inhibitor apoptózy

# OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE.....	1
3	MEZENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY.....	2
3.1.	Historie a základní charakteristika MSC.....	3
3.2.	Diferenciace MSC.....	6
3.3.	Zdroje a původ MSC.....	7
4	NÁDOROVÁ BIOLOGIE.....	8
4.1.	Charakteristické znaky nádorových buněk.....	9
4.1.1.	Schopnost neomezené replikace.....	11
4.1.2.	Udržování proliferací signalizace.....	11
4.1.3.	Únik před faktory potlačujícími růst.....	12
4.1.4.	Odolnost vůči buněčné smrti.....	12
4.1.5.	Indukce angiogeneze.....	13
4.1.6.	Aktivace invaze a metastázování.....	13
4.1.7.	Přeprogramování buněčného metabolismu a únik před imunitním systémem.....	13
4.2.	Mikroprostředí nádoru.....	14
5	INTERAKCE MSC S NÁDOROVÝMI BUŇKAMI A MIKROSPŮSTŘEDÍM NÁDORU.....	15
5.1	Role endogenních MSC v nádorové tkáni.....	15
5.2	Možnosti studia buněčných interakcí.....	17
5.3	Příklady potlačení rakovinného bujení působením MSC.....	18
5.3.1	Zastavení buněčného cyklu nádorových buněk.....	18
5.3.2	Inhibice vaskularizace nádoru.....	18
5.3.3	Potlačení signální kaskády Wnt.....	19
5.3.4	Potlačení proliferace, migrace a indukce apoptózy nádorových buněk.....	20
5.3.5	MSC jako nosiče molekul s terapeutickým účinkem.....	21
5.4	Příklady podpory rakovinného bujení působením MSC.....	23
5.4.1	Podpora proliferace a potlačení apoptózy nádorových buněk.....	23
5.4.2	Podpora vaskularizace nádoru.....	23
5.4.3	Imunomodulační účinek MSC.....	24
5.4.4	Podpora invazivity a tvorby metastáz.....	26
5.4.5	Inkorporace MSC do nádorového mikroprostředí.....	26

5.4.6	Ochrana nádorových buněk před léčivy.....	28
6	<b>KRITICKÉ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ÚČINEK MSC.....</b>	<b>28</b>
7	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>31</b>
8	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>32</b>

# 1 ÚVOD

Výskyt různých nádorových onemocnění se v posledních desetiletích významně zvyšuje a přibývá také množství rizikových faktorů, které se na vzniku a rozvoji těchto onemocnění podílejí. Úměrně tomuto nárustu se proto zvyšuje tendence hledat nové způsoby či nástroje, jak se s nádorovými onemocněními v klinické praxi, léčbě ale i prevenci co nejúčinněji a zároveň nejšetrněji vypořádat. Jedním z perspektivních nástrojů se zdají být právě mezenchymální kmenové buňky (MSC).

MSC jsou multipotentní buňky nehematopoetického charakteru. Pro své trofické, imunomodulační a diferenciační vlastnosti se zdají být vhodnými adepty pro využití v klinické praxi. Zvýšenou pozornost si tyto buňky v posledních letech také vyžádaly i díky schopnosti samovolně migrovat do místa zánětu, lokálního poškození tkáně či nádoru. Díky těmto vlastnostem mají MSC velký potenciál stát se nejen nástrojem pro podporu reparace a regenerace tkání, ale také pro potlačování některých významných patologických jevů, jakým jsou například některé typy nádorového bujení. Na základě mnohých *in vitro* (tkáňové kultury) i *in vivo* (zvířecí modely) studií se však ukazuje, jak nejednoznačné účinky mohou MSC vůči svému okolí v daném prostředí vykazovat. Zatímco v některých případech MSC vykazují protinádorové účinky, v jiných případech naopak rozvoj nádorového bujení podporují.

Zdá se, že účinek MSC je extrémně závislý na kontextu, ve kterém se tyto buňky vyskytují, tj. např. na typu tkáně a charakteru buněk v ní obsažených, na vlastnostech interakce mezi buňkami či imunitním systémem daného organismu atd. Tento dvojitý vliv MSC na nádorové bujení lze demonstrovat na řadě protichůdných výsledků pocházejících z různých studií, které se zabývají problematikou interakcí MSC a rakovinných buněk.

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je demonstrovat na vybraných příkladech dvojitý vliv MSC na nádorové bujení a zdůraznit tak existenci protinádorových i pronádorových účinků MSC na okolní buňky a tkáň. Tato bakalářská práce má také čtenáře upozornit na fakt, že nezbytným předpokladem pro budoucí bezpečné terapeutické užití MSC v klinické praxi je právě dokonalá znalost chování a vlastností MSC jak na *in vitro* ale také na *in vivo* úrovni. Pouze dobrá znalost MSC může z těchto buněk

učinít bezpečný, dobře uchopitelný a dlouhodobě předvídatelný nástroj pro použití v klinické či laboratorní praxi.

### **3 MEZENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY**

Pojem kmenové buňky definuje buňky, které spojuje schopnost neustálé proliferace a diferenciací do různých buněčných typů. Tyto buňky lze klasifikovat několika způsoby, typicky však podle diferenciacího potenciálu či podle jejich původu. Z hlediska diferenciacího potenciálu jsou kmenové buňky klasifikovány podle diferenciací kapacity, tedy schopnosti a potenciálu diferencovat se do různých buněčných typů – podle toho rozlišujeme totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní buňky.

Totipotentní buňky jsou kmenové buňky, které disponují největším diferenciacím potenciálem, jako jediné mají schopnost se diferencovat do jakéhokoliv buněčného typu, který se v organismu vyskytuje, mohou dát vzniku embryoblastu i trofoblastu a tedy celému organismu. Pluripotentní buňky mají diferenciací potenciál o něco nižší než předchozí typ buněk, dávají vzniknout všem buňkám v organismu s výjimkou trofoblastu. Multipotentní buňky se zpravidla diferencují do více než jednoho buněčného typu. Nejmenší diferenciací kapacitu mají unipotentní buňky, které jsou schopny se terminálně diferencovat pouze do jediného buněčného typu a lze je tedy do určité míry označit za nejvíce „specializované“ z kmenových buněk (Hima Bindu and Srilatha, 2011).

Dle původu můžeme kmenové buňky rozlišovat na přirozené embryonální (ESC), fetální (FSC), přirozené dospělé (ASC) a indukované pluripotentní (iPSC) (Hima Bindu and Srilatha, 2011). Za přípravu iPSC z myších fibroblastů byla v roce 2012 udělena Nobelova cena (Ochi, 2013; Takahashi and Yamanaka, 2006). Speciálním typem kmenových buněk jsou pak tzv. nádorové kmenové buňky (CSC).

Tato práce je zaměřena na MSC, které můžeme dle výše zmíněné klasifikace popsat jako multipotentní kmenové buňky, nebo jako ASC.

Potenciál MSC pro využití v klinické praxi je dán zejména jejich trofickou a imunomodulační funkcí a diferenciací kapacitou, dále pak relativně snadnou dostupností, finančně nenáročnou izolací a kultivací a také možností jak autologního, tak alogenního použití při transplantaci (autologní – vlastní buňky pacienta, alogenní – buňky od geneticky nepříbuzného dárce stejného živočišného druhu). Dalším faktorem, který zvyšuje potenciál MSC je i možnost genetických

modifikací (Tehrani et al., 2018). V neposlední řadě jsou zde velkou výhodou významně nižší etické požadavky na získávání a používání MSC, než je tomu např. u ESC, jejichž používání je i v současné době předmětem mnoha diskuzí.

### 3.1. Historie a základní charakteristika MSC

Existence nehematopoetických buněk schopných samoobnovy byla poprvé popsána v sedmdesátých letech minulého století Alexanderem Friedensteinem na transplantátech kostní dřeně (úvahy o existenci takových buněk však byly formulovány mnohem dříve) (Friedenstein et al., 1968). Na základě morfolgie, která připomíná fibroblasty, byly tyto buňky nejprve popsány jako dřeňové fibroblasty (bone marrow fibroblasts) a jejich charakterizace byla dále rozšířena o schopnost tvořit uniformní kolonie (od toho je odvozen dnes běžně užívaný termín „colony-forming units fibroblasts“ (CFU-Fs)) (Friedenstein et al., 1970, 1976) V procesu izolace těchto buněk bylo dále využito schopnosti těchto buněk adherovat k plastovému povrchu, což je mj. jedna ze základních vlastností, kterými jsou dnes MSC oficiálně definovány. Postupem času další studie ukázaly, že tyto buňky lze nalézt a izolovat i z jiných tkání než pouze z kostní dřeně (viz. kap. 3.3.).

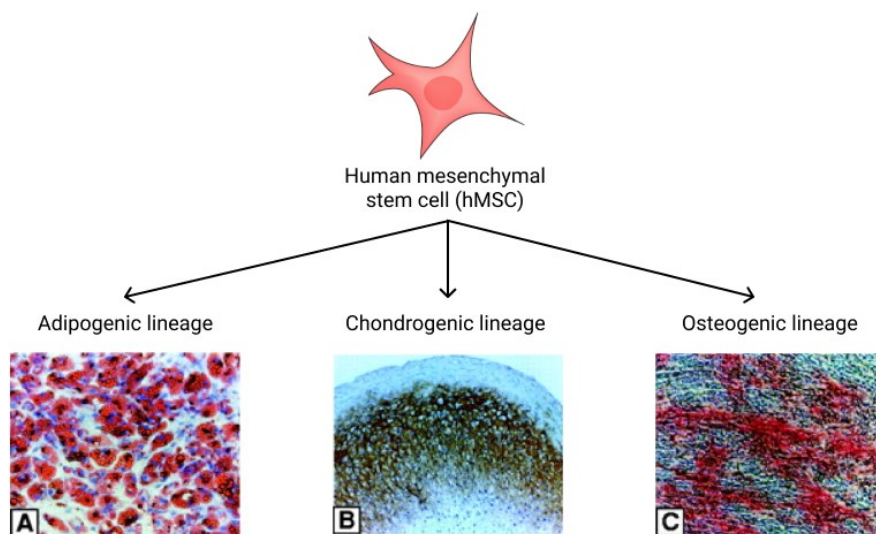
Název „mezenchymální kmenová buňka“ poprvé použil až Arnold I. Caplan ve svém přehledovém článku, ve kterém porovnával MSC získané z různých tkání, a to jak embryonálních, tak i dospělých. Součástí Caplanova článku byla i hypotéza o potenciálu MSC pro budoucí terapeutické využití v klinické praxi a možnostech manipulace MSC na *in vitro* úrovni (Caplan, 1991).

Přibývajícím množstvím studií zaměřených na studium MSC postupně ukázalo značnou různorodost těchto buněk. Z toho postupem času vyplynula potřeba jasně formulovat vlastnosti, kterými jsou MSC specifické a stanovit parametry, dle kterých mohou být tyto buňky jasně definovány. Proto byla v roce 2006 Mezinárodní společností pro buněčnou terapii (International Society for Cellular Therapy) ustanovena tzv. minimální kritéria, umožňující definovat MSC a odlišit je tak od jiných buněk. Minimální kritéria jsou shrnuta v tabulce níže (Tab.1.).

1	Adheze k plastovému povrchu za standardních kultivačních podmínek	
2	Expresí markerů na buněčném povrchu:	
	Pozitivní	Negativní
	CD73 (5'-nukleotidáza)	CD45
	CD90 (Thy-1)	CD34
	CD105 (endoglin)	CD14 nebo CD11b
		CD79α nebo CD19
		HLA-DR
3	Diferenciace v <i>in vitro</i> podmínkách do osteoblastů, adipocytů a chondroblastů	

**Tabulka 1.** Převzato a upraveno podle (Dominici et al., 2006)

Jak ukazuje Tab.1., MSC jsou definovány třemi základními podmínkami: 1) schopností adherovat k plastovému povrchu, 2) expresí specifických markerů (negativních i pozitivních) na svém povrchu a 3) schopností diferencovat v *in vitro* podmínkách do třech základních buněčných typů – do osteoblastů, adipocytů a chondroblastů. Diferenciace MSC odvozených z kostní dřeně (BM-MSC, bone marrow-derived MSC) je znázorněna na Obr.1.



**Obrázek 1 - Diferenciace izolovaných BM-MSC do buněk různých linií.** *In vitro* diferenciace MSC izolovaných z kostní dřeně do adipogenní, chondrogenní a osteogenní linie. Barveno (A) olejová červen (Oil Red), (B) imunohistochemické barvení na kolagen typu II, (C) alizarinová červen (Alizarin Red). Převzato a upraveno podle (Pittenger et al., 1999)

Pozitivními markery, které na svém povrchu MSC exprimují jsou CD73, CD90 a CD105. Negativní markery, jsou markery specifické pro buňky hematopoetické linie, ty by MSC na svém povrchu neměly exprimovat vůbec nebo jen ve velmi omezené míře (max. 2 %). Jedná se o CD45 (pan-leukocytový marker), CD34 (marker primitivních hematopoetických progenitorů a

endoteliálních buněk), CD14 a CD11b (markery specifické pro monocyty a makrofágy) a CD79a a CD19 (markery B-buněk (B-lymfocytů)). Posledním ze standardních negativních markerů je HLA-DR [human leukocyte antigen DR isotype, povrchový receptor MHC II (hlavní histokompatibilní komplex třídy II)], jedná se o marker specifický zejména pro B-buňky, dendritické buňky a makrofágy. U tohoto negativního markeru však platí výjimka - MSC mohou tento marker exprimovat na svém povrchu, ale pouze na základě předchozí stimulace interferonem gamma (IFN- $\gamma$ ). V takovém případě je však doporučováno označit MSC jako „stimulované“, nebo jiným způsobem zdůraznit jejich změněný/nepůvodní stav (Dominici et al., 2006).

Jisté nejasnosti stále panují ohledně negativního markeru CD34. Zdá se, že MSC exprimují CD34 jen jistou dobu po izolaci z tkáně a později tento povrchový antigen postupně ztrácejí. Proto tedy buňky pocházející z *in vitro* kultivace tento marker zpravidla neexprimují (Pittenger et al., 1999). Studie poukazující na přítomnost CD34 u MSC bezprostředně po izolaci tedy naznačují, že negativní nález CD34 není dán samotným charakterem studovaných buněk, ale je důsledkem pozdější kultivace (Kaiser et al., 2007; Scherberich et al., 2013)

I přesto, že je dnes o vlastnostech MSC známo mnohem více než jak tomu bylo v době zavedení těchto kritérií v roce 2006, k žádným dalším významným aktualizacím doposud nedošlo a výše zmíněná kritéria jsou tak stále zlatým standardem pro charakterizaci MSC.

Velký otazník i nadále zůstává nad neucelenou nomenklaturou MSC. V současné praxi se uplatňuje široce uznávaná zkratka, MSC, ta je však v anglickém jazyce použitelná pro dva odlišné názvy, které jsou běžně v praxi užívány: mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells) a mezenchymální stromální buňky (mesenchymal stromal cells). I přesto, že je zkratka MSC takto nejednoznačná, nebyla doposud změněna a ani samotný název MSC nebyl doposud sjednocen. Důvodem je mimo jiné i obava o porušení kontinuity v dohledávání vědeckých publikací (Horwitz et al., 2005).

V současnosti sám Arnold Caplan, autor pojmenování „mezenchymální kmenové buňky“ (Caplan, 1991), usiluje o přejmenování MSC (Caplan, 2017a). Současný název je podle něho velmi zavádějící, protože základní funkcí kmenových buněk v organismu je mj. schopnost vytvářet různé typy buněk a nahrazovat poškozenou tkáň a tuto funkci podle něho MSC v *in vivo* podmínkách nezastávají. Z tohoto důvodu by tedy MSC neměly být řazeny mezi kmenové buňky. Caplan proto přichází s návrhem přejmenovat MSC na tzv. „Medicinal Signaling Cells“ (tento název zároveň zachovává široce používanou zkratku MSC). Podle Caplana tento termín více



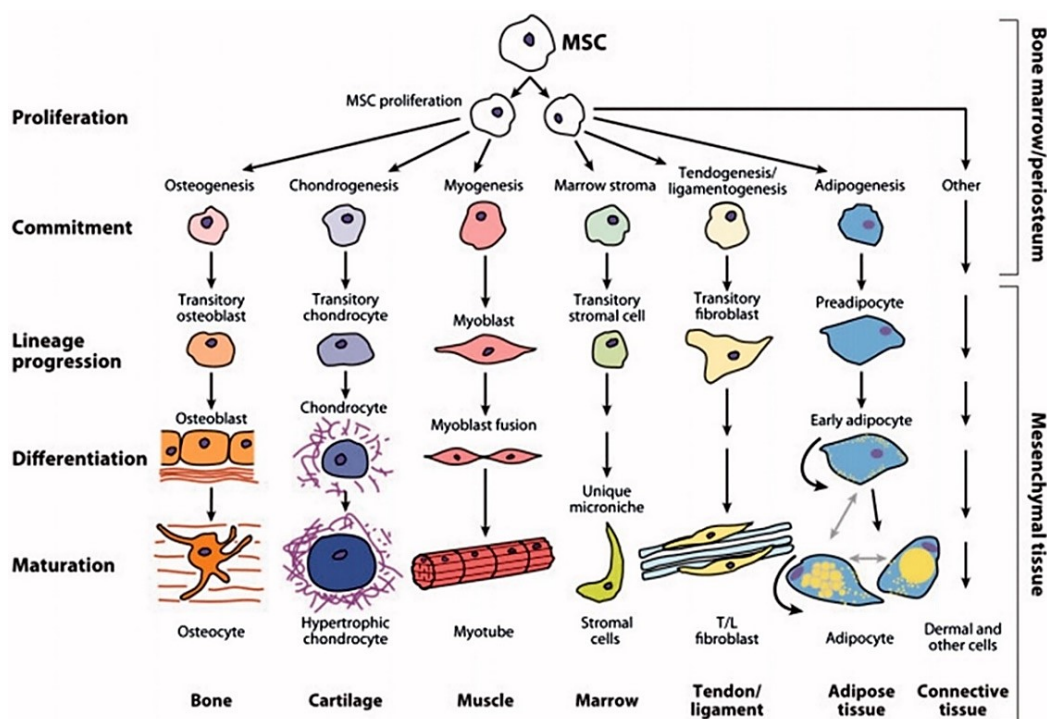
odráží skutečné vlastnosti MSC, kterými jsou (jak se ukázalo v posledních letech) zejména sekrece trofických faktorů a imunomodulační schopnosti pozitivně působící na regeneraci. Proti přijetí nového názvu ale stojí například velký počet klinických studií pracujících s původním názvem respektive názvy MSC (viz výše). Navíc zde panují obavy, že samotná změna názvu by mohla způsobit nejasnosti a být matoucí i pro širokou veřejnost (Caplan, 2017a).

### 3.2. Diferenciace MSC

Jak bylo uvedeno v kapitole 3.1., MSC jsou definovány jako buňky s multipotentní diferenciální kapacitou - mají schopnost diferencovat (minimálně) do osteogenního, adipogenního a chondrogenního buněčného typu. Úroveň diferenciace MSC a přítomnost buněk daného typu v kultuře lze detekovat např. specifickým barvením (viz. Obr. 1). Pro detekci osteoblastů se typicky používá alizarinová červen (Alizarin Red), nebo barvení dle von Kossa, které specificky barví vápník. Pro detekci adipocytů je běžně užívána olejová červen (Oil Red) barvicí tukové kapénky a pro detekci chondroblastů je používána buď alcianová modř barvicí glykosaminoglykany a glykoproteiny nebo imunohistochemické barvení kolagenu typu II, který je typickou složkou kloubní chrupavky (Bensimon-Brito et al., 2016; Dominici et al., 2006; Smith et al., 2018).

Diferenční potenciál MSC se v průběhu času dále rozšířil o schopnost diferencovat do dalších typů buněk. Již dříve byla experimentálně doložena schopnost MSC diferencovat do buněk mezodermálních tkání, konkrétně se jednalo o buňky myogenní linie (Beier et al., 2011) (Gronthos et al., 2000), buňky tvořící šlachy a vazy (Cardwell et al., 2014) (Yin et al., 2016) a stromální buňky tvořící dřev.

Příklady diferenciace MSC do jednotlivých buněčných typů jsou přehledně zachyceny na obrázku níže (Obr. 2).



**Obrázek 2 - Schéma diferenciační kapacity MSC.** MSC mají schopnost diferencovat do několika různých buněčných typů: osteocytů, chondrocytů, myotub, stromálních dřevných buněk, fibroblastů, adipocytů a dalších buněk pojivových tkání. Převzato z (Caplan, 2017a)

Existují ale i studie, které popisují schopnost MSC diferencovat i do buněk ektodermálního původu (konkrétně nervové tkáně) (Anghileri et al., 2008) či buněk endodermálního původu (např. hepatocytů a beta buněk pankreatu) (Al Ghrbawy et al., 2016; Shivakumar et al., 2019). Přestože je většina výše zmíněných příkladů obecně kladně přijata, kolem vzniku nervové tkáně panuje i nadále řada kontroverzí.

### 3.3. Zdroje a původ MSC

Tkání, ve které byly MSC prvně objeveny a popsány, byla kostní dřeň (Friedenstein et al., 1968). Izolace MSC z kostní dřene je však značně invazivní, časově náročná a pro dárce často bolestivá. Z toho důvodu zesílila tendence hledat i jiné tkáně, ze kterých lze MSC získat. Takovými tkáněmi jsou typicky tuková tkáň, pupečnicková a periferní krev (Wagner et al., 2005), dále zubní pulpa (Gronthos et al., 2000), slinné žlázy (Rotter et al., 2008), placenta (Raynaud et al., 2012) nebo Whartonův rosol (měkká pojivová tkáň v pupeční šňůře) (Hou et al., 2009) a další.

V posledních letech se lze, mimo jiné, také setkat s teorií, že MSC jsou odvozeny od perivaskulárních buněk obklopujících endoteliální buňky (EC), z tzv. pericytů. Na základě čehož

mohou být MSC izolovány ze všech vaskularizovaných tkání v těle (tedy z oblastí tzv. perivaskulárních nik, bezprostředního okolí cév) (Crisan et al., 2008; Oh and Nör, 2015). Tento koncept se zároveň staví proti původní teorii o původu MSC v roli kmenových buněk, což koresponduje s názory Caplana, který tuto teorii podporuje a také sám dále rozvíjí (Caplan, 2017b). Tato nová teorie vycházející z MSC jako pericytů ukazuje, že multipotentní potenciál lze pozorovat pouze u MSC kultivovaných v *in vitro* podmínkách, či v případě transplantace *in vitro* kultivovaných MSC do testovacích živých systémů, ale nelze ji pozorovat u organismu vlastních (rezidentních) MSC. Tento jev byl však prokázán studií mapující osud MSC/pericytů pouze z některých tkání *in vivo* a proto ho zatím nelze zcela zobecnit (Guimarães-Camboa et al., 2017).

Standardní izolací MSC nelze většinou získat dostatečné množství buněk pro běžné terapeutické účely, u kostní dřeně je to např. pouze přibližně 0,001 až 0,01% buněk z celé izolace (Pittenger et al., 1999). Z toho důvodu je zcela zásadní následná kultivace v *in vitro* podmínkách, která umožní dostatečnou expanzi MSC pro další užití. Problémem, se kterým se ale můžeme při *in vitro* expanzi setkat, je nezanedbatelná proměnlivost a nestabilita vlastností MSC vlivem opakovaného pasážování a dlouhodobějšího pobytu MSC v arteficiálních podmínkách (Kozłowska et al., 2019).

Významným hlediskem pro terapeutickou aplikaci MSC je kromě počtu pasáží (při expanzi v *in vitro* podmínkách), také tkáňový zdroj MSC, protože MSC vykazují značnou tkáňovou heterogenitu závislou na charakteru mikroprostředí tkání, ze kterých pocházejí. Z hlediska tkáňového původu lze MSC dělit na různé tkáňově specifické „subpopulace“, které se vzájemně od sebe liší řadou fenotypových znaků a projevů. Příkladem může být sekrece odlišných trofických faktorů, exprese odlišných povrchových markerů (např. CD146, Sox2, Oct4, PW1 apod.), rychlost proliferace, různě účinné proangiogenní a migrační schopnosti či odlišná diferenciací preference a kapacita. Pro účely klinické aplikace je proto vždy důležité zvážit zdroj MSC s preferovanou biologickou aktivitou tak, aby bylo dosaženo požadovaného výsledku (Kozłowska et al., 2019; Liu et al., 2019).

## 4 NÁDOROVÁ BIOLOGIE

Za poslední desetiletí patří nádorová onemocnění k jedné z nejčastějších příčin smrti. V posledních letech se jedná zhruba o 9 milionů úmrtí ročně a mortalita se stále rok od roku zvyšuje (Roser and Ritchie, 2015). Příčin vzniku nádorových onemocnění je nespočet, mezi hlavní rizikové

faktory přispívající k jejich vzniku a rozvoji patří například infekční onemocnění různého původu, hormonální změny v organismu či nadměrné vystavení organismu UV a ionizujícímu záření.

Dalším klíčovým rizikovým faktorem je i životní styl zahrnující užívání tabákových výrobků, nedostatečný pohyb, obezita nebo například zvýšené požívání alkoholu. Významnou roli hraje často také genetická predispozice a vyšší věk (Stein and Colditz, 2004).

Přestože k nádorové transformaci může dojít ve většině tkání lidského těla, zvýšenou predispozici k těmto změnám mají rychle se obnovující tkáně, charakterizované zvýšenou proliferací buněk, jako jsou např. orgány trávicího traktu, dýchací soustavy nebo krev či tkáně pod významnějším hormonálním dohledem (tkáň pohlavních orgánů, prsní tkáň atd.). To mj. vyplývá i z obecných statistik sledujících výskyt konkrétních typů rakoviny napříč populací (Bray et al., 2018; Siegel et al., 2019).

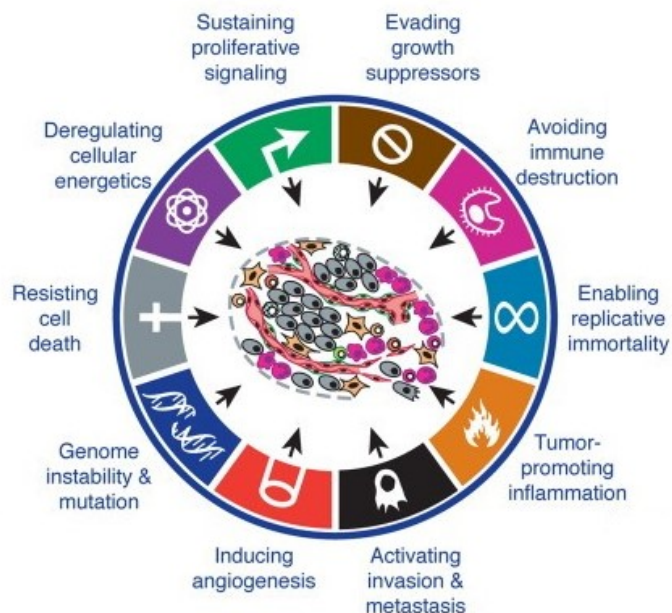
Problematika nádorových buněk a obecně nádorových onemocnění je velmi složitá a komplexní, proto bude pro účely této bakalářské práce v následujících podkapitolách rozebrán pouze přehled základních charakteristik.

#### 4.1. Charakteristické znaky nádorových buněk

Nádorové buňky vznikají přeměnou buněk vlastního organismu v tzv. procesu tumorigeneze. Za nádorovou transformaci jsou z velké části zodpovědné jednak mutace v tumor supresorových genech a také mutace v tzv. protoonkogenech (genech spojených s regulací buněčného cyklu, jejichž mutovanou formu označujeme jako onkogeny). Klíčovou úlohu v nádorové transformaci mohou sehrát také mutace na úrovni reparačních genů (Pritchard et al., 2016) nebo geny účastníci se regulace apoptózy (Al-Fatlawi et al., 2015).

Začátkem tohoto století představili Douglas Hanahan a Robert A. Weinberg myšlenku, že přes obecnou heterogenitu nádorových onemocnění vykazují nádorové buňky určité společné rysy (Hanahan and Weinberg, 2000). Soubor těchto vlastností, tzv. „Hallmarks of cancer“, byl dále vlivem dalšího studia o dekádu později autory aktualizován (Hanahan and Weinberg, 2011).

Tyto vlastnosti zahrnují osm základních vlastností - schopnost neomezené replikace, udržování proliferační signalizace, únik před faktory potlačujícími buněčný růst, zvýšená odolnost vůči buněčné smrti, indukce angiogeneze, aktivace invazivity a schopnosti tvořit vzdálená ložiska – metastáze, přeprogramování buněčného metabolismu a únik před imunitním systémem (Obr. 3.) (Hanahan and Weinberg, 2011).



**Obrázek 3 - Schéma základních vlastností nádorových buněk vč. podpůrných vlastností.** Základní vlastnosti jsou schopnost udržování proliferací signálizace, únik před faktory potlačujícími buněčný růst, schopnost neomezené replikace, invazivita a schopnost metastázování, indukce angiogeneze a odolnost vůči buněčné smrti. Podpůrnými vlastnostmi nádorových buněk jsou pak zánět a nestabilita genomu. Převzato z (Hanahan and Weinberg, 2011).

Dalšími významnými vlastnostmi, které výrazně ovlivňují a podporují ostatní výše zmíněné znaky jsou **zánět indukovaný nádorem** a **nestabilita genomu nádorových buněk** (Obr. 3.). Indukce zánětlivého prostředí přináší výhodu z hlediska dodávky bioaktivních molekul do nádorového mikroprostředí, včetně růstových faktorů podporujících proliferaci, faktorů omezujících buněčnou smrt, proangiogenních faktorů a enzymů, které modifikují extracelulární matrix a usnadňují tak například kromě angiogeneze (procesu tvorby nových krevních kapilár) i invazi nádorových buněk (Erez et al., 2010; Shen et al., 2017).

Nestabilita genomu nádorových buněk je potom zdrojem četných mutací, které mohou mít za následek vznik nových a nádorem preferovaných vlastností (Hanahan and Weinberg, 2011).

Další významnou prací zabývající se „Hallmarks of cancer“ a shrnující další poznatky je například přehledový článek autorů Fouad a Annei (Fouad and Aanei, 2017). Přestože se jedná o podstatně novější práci, tato bakalářská práce bude vycházet z původního rozdělení vlastností nádorových buněk dle Hanahan a Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011), protože pro následné pochopení interakcí mezi nádorovými buňkami a MSC poslouží toto dělení lépe.

#### 4.1.1. Schopnost neomezené replikace

Společným rysem nádorových buněk je tzv. imortalizace, **schopnost nekonečné replikace** buněk bez známek replikativního stárnutí (senescence) a krize, která zahrnuje buněčnou smrt. Za běžných fyziologických podmínek dochází u normálních buněk ke stárnutí vlivem progresivního zkracování telomer. Tento jev popisuje tzv. Hayflickův limit, který udává maximální možný počet mitotických dělení (Hayflick and Moorhead, 1961). Ke zkracování telomer nedochází kromě nádorových buněk také například u CSC, ESC či mužských zárodečných buněk, díky funkci specializované DNA polymerázy – telomerázy (Shay and Wright, 2010). Mnohé studie navíc ukazují, že některé složky telomerázy, například komponenta hTERT, mohou mít vliv i na další významné vlastnosti nádorových buněk (např. odolnost vůči apoptóze, invazivitu a schopnost tvorby metastáz) a obecně tumorigenezi nezávisle na prodlužování telomer (Cao et al., 2002; Liu et al., 2013; Stewart et al., 2002).

Další možností, jak zabránit zkracování telomer v některých buňkách je cesta alternativního prodloužení telomer, založená na homologní rekombinaci, tzv. alternative lengthening of telomeres (ALT), ke které u některých nádorových buněk také dochází (Zhang et al., 2019).

#### 4.1.2. Udržování proliferální signalizace

Jednou z typických vlastností rakovinných buněk je **schopnost udržovat si chronickou proliferaci**. Pro správnou a fyziologicky přirozenou proliferální aktivitu buněk je třeba parakrinní působení okolních buněk tzv. mitogenními faktory. V netransformovaných buňkách je produkce mitogenních faktorů navozujících vstup a průchod buněčným cyklem a tedy buněčnou proliferaci pečlivě kontrolována. Tento typ signalizace je zajištěn a udržován například růstovými faktory vázícími se na receptory spřaženými s intracelulárními tyrosin-kinázami (RTK). U rakovinných buněk však dochází jednak k deregulaci těchto mechanismů, např. vlivem mutací RTK či nadměrnou expresí RTK (Red Brewer et al., 2013; Selvaggi et al., 2004), ale také se zde uplatňuje schopnost vymanit se z vlivu vnějších růstových faktorů zapojením tzv. autokrinní stimulace, nebo stimulací stromálních buněk nádorového mikroprostředí k produkci růstových faktorů (Raimondo et al., 2015).

### 4.1.3. Únik před faktory potlačujícími růst

Schopnost nádorových buněk **uniknout či obejít faktory potlačující růst** je v úzkém vztahu s poruchou funkce tumor supresorových genů a jejich produktů. Významnými tumor supresorovými geny člověka jsou například gen *TP53* a retinoblastomový gen (*RB*), jejichž produkty jsou proteiny p53 a RB. RB reguluje postup buněčným cyklem v závislosti na intracelulárních i extracelulárních podmínkách. Další postup v buněčném cyklu je zprostředkován jeho inaktivací pomocí fosforylace CDK. Protein p53 je hlavním zprostředkovatelem kontrolního bodu v buněčném cyklu, který monitoruje poškození DNA. V případě poškození dochází k zastavení buněčného cyklu a opravě chyb. Pokud nelze poškození opravit, p53 vyvolává apoptózu buňky. Poruchy ve funkci RB a p53 patří k velmi častým mutacím napříč různými typy nádorového bujení, díky kterým tak dochází k nekontrolovatelnému dělení buněk (Liu et al., 2010; Thangavel et al., 2017).

### 4.1.4. Odolnost vůči buněčné smrti

Rozlišujeme obecně dva mechanismy vedoucí k programované buněčné smrti a to vnější cestu regulace apoptózy a vnitřní. Vnější cesta zahrnuje interakci tzv. receptorů smrti – Fas, na buněčném povrchu, s jejich ligandy FasL a TNF (tumor necrosis factor). Vnitřní cesta potom závisí na intracelulární signalizaci mezi proapoptotickými (např. Bax) a protiapoptotickými faktory (např. Bcl-2). Při posunu rovnováhy směrem k proapoptotickým faktorům dochází ke smrti buňky. Nádorové buňky však vyvíjejí řadu strategií pro omezení nebo obcházení mechanismů způsobujících apoptózu (Chen et al., 2018; Dinami et al., 2017; Ripka et al., 2010; Yi et al., 2016).

Dalším způsobem jak se nádorové buňky vyhýbají buněčné smrti je zapojení mechanismu autofágie. Pomocí autofágie vytvářejí nádorové buňky metabolity s nízkou molekulovou hmotností a „recyklují“ intracelulární složky, které podporují jejich přežití ve stresu, kterému jsou nádorové buňky často vystaveny (Abedin et al., 2007).

Je nutné zdůraznit, že označení nádorových buněk jako **odolných vůči buněčné smrti**, může být zavádějící. Ačkoliv je výsledkem výše popsaných změn zvýšené přežití nádoru, neznamená to, že všechny nádorové buňky odolávají buněčné smrti. Pokud by k buněčné smrti vůbec nedocházelo, nádory by například narostly do absurdních velikostí. Apoptóza zároveň v tomto případě může plnit roli v odstranění méně vhodných linií a uvolnění prostoru pro vhodnější klony (Labi and Erlacher, 2015).

#### 4.1.5. Indukce angiogeneze

Přestože tvoří nádory do jisté míry samostatné útvary v organismu, jsou závislé na cévním zásobení, které umožňuje přívod živin a kyslíku a zároveň odvod zplodin metabolismu a oxidu uhličitého. Nejdůležitějším spouštěčem angiogeneze je hypoxie – nedostatek kyslíku v nádorovém mikroprostředí. Při hypoxii dochází v buňkách k nárůstu hladiny hypoxií indukovaného transkripčního faktoru (hypoxia-inducible factor, HIF), který je zodpovědný za odpověď buněk na nedostatek kyslíku v tkáni. HIF stimuluje například genovou expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor, VEGF), který hraje klíčovou roli v angiogenezi indukci vzniku nových cév. Takto nově vznikající vaskulatura vzniká procesem tzv. nádorové neovaskularizace, která je definována jako **tvorba nových krevních cév** vyskytujících se v abnormální tkáni nebo v abnormální poloze (Oladipupo et al., 2011).

#### 4.1.6. Aktivace invaze a metastázování

**Aktivace invaze nádorových buněk a schopnost metastázovat** je hlavním aspektem tvorby vzdálených ložisek, ze kterých vznikají sekundární nádory (metastáze). Průběh vzniku metastáz popisuje invazivní – metastázová kaskáda (invasion-metastasis cascade), která se skládá z invaze přes extracelulární matrix (ECM), intravazace – průniku z tkání do krve a lymfatických cév a následného transportu nádorových buněk oběhem, extravazace – výstupu z cév do parenchymu vzdálených orgánů, vzniku mikrometastáz a posledního kroku označovaného jako kolonizace – tvorby makrometastáz. Za tento proces je pravděpodobně zodpovědný epiteliálně–mezenchymální přechod (EMT, epithelial–mesenchymal transition), ke kterému dochází přirozeně i během embryonálního vývoje, kdy je tímto způsobem usnadněna tvorba orgánů a přeskupování buněk. EMT je také doprovázen postupným snižováním hladin adhezivního E – kadherinu a naopak zvyšováním exprese mezenchymálního N – kadherinu, který je spojován s buněčnou migrací. Při adhezi a extravazaci buněk do cílových tkání dochází k opačnému procesu a to mezenchymálně – epiteliálnímu přechodu (MET) (Ma et al., 2018; Yeung and Yang, 2017).

#### 4.1.7. Přeprogramování buněčného metabolismu a únik před imunitním systémem

Poslední dvě vlastnosti, které byly mezi hlavní znaky nádorových buněk zařazeny až později, jsou schopnost přeprogramování buněčného metabolismu a únik před imunitním systémem.



Proces **přeprogramování buněčného metabolismu** v nádorových buňkách, poprvé popsal ve dvacátých letech minulého století Otto Warburg. Popsal jej jako závislost transformovaných buněk na aerobní glykolýze, tedy tendenci transformovaných buněk preferovat glykolýzu před oxidativní fosforylací i za přítomnosti kyslíku (Warburg, 1925). Tento jev je dnes znám jako tzv. Warburgův efekt.

Nejprve byl tento jev považován za defekt mitochondrií a poškozené buněčné dýchání (Warburg, 1956). Později se však ukázalo, že Warburgův efekt není unikátní pouze pro nádorové buňky, ale jedná se o standardní fyziologický děj, probíhající u rychle proliferujících buněk jako jsou například T lymfocyty (Medzhitov, 2015). Existuje také hypotéza o tom, že k podobnému efektu dochází i v rámci metabolismu pluripotentních kmenových buněk (Cha et al., 2017; Varum et al., 2011).

I přesto, že se významem Warburgova efektu zabývalo a intenzivně zabývá velké množství studií, jeho přesná funkce pro růst nádoru zůstává dodnes neobjasněna. Existuje několik hypotéz, které se pokouší význam tohoto jevu objasnit. Příkladem je hypotéza, podle které zvýšená produkce laktátu nádorovými buňkami v procesu glykolýzy potlačuje funkci buněk imunitního systému, konkrétně T lymfocytů a NK buněk, a dochází tak k **úniku nádoru před imunitním systémem** (Brand et al., 2016), což je mj. další charakteristikou vlastností nádorových buněk. Zároveň také soupeřením nádorových buněk s T lymfocyty o přítomné zdroje glukózy dochází k utlumení aktivity T lymfocytů (Chang et al., 2015).

Další způsob, jakým nádorové buňky unikají před imunitním systémem, je např. sekrece imunosupresivních faktorů (např. TGF- $\beta$ ), které napomáhají deaktivovat buňky imunitního systému (Rong et al., 2016). Role úniku nádorových buněk před imunitním systémem je podpořena mj. i skutečností, že výskyt nádorových onemocnění je obecně vyšší u imunodeficitních osob (primární i získaná imunodeficeience) než je tomu u osob imunokompetentních.

## 4.2. Mikroprostředí nádoru

Klíčovou roli v přežití, růstu a rozvoji nádoru zastává nádorové mikroprostředí. V nádorovém mikroprostředí panují specifické podmínky, zejména nedostatek kyslíku (hypoxie) a snížené pH (acidóza) (Koukourakis et al., 2006). Nádory nejsou tvořeny pouze homogenní populací nádorových buněk, ale obsahují množství dalších buněčných i nebuněčných komponent jako například fibroblasty, makrofágy a další prvky imunitního systému, EC, MSC, pericyty a ECM

atd. Svou složitostí a komplexností tak mohou nádory převyšovat i některé tkáně ve zdravém organismu (Ge et al., 2019; Guo and Deng, 2018)

Buňky imunitního systému zpočátku infiltrují do nádoru s cílem zničit abnormální útvar. Nádorové prostředí však vykazuje imunosupresivní vlastnosti, což vede k selhání složek imunitního systému v jejich cytotoxické funkci a podporuje tak toleranci nádoru organismem (Huang et al., 2012; Piersma, 2011).

Součástí nádoru jsou také tzv. nádorové kmenové buňky (cancer stem cells, CSC), které jsou považovány za iniciační buňky nádorového bujení. Z tohoto důvodu jsou někdy CSC označovány jako tzv. tumor – iniciační buňky (tumor – initiating cells, TIC) (Wang et al., 2019).

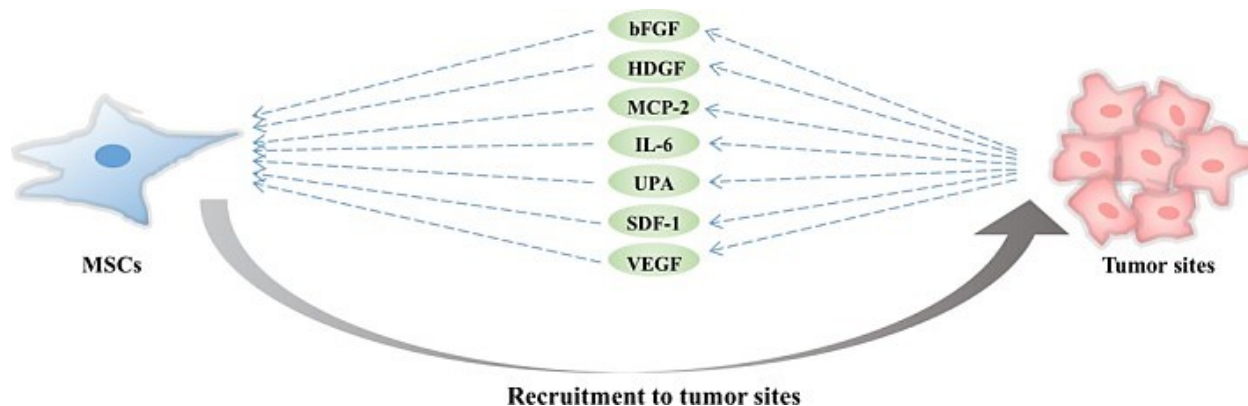
Přestože CSC nejsou odvozeny od kmenových buněk, nesou některé velmi podobné vlastnosti jako kmenové buňky, jako například schopnost sebeobnovy. CSC podléhají symetrickému dělení, což umožňuje jejich další expanzi vedoucí k dlouhodobému relapsu onemocnění a selhání terapie (Xu et al., 2018). Významnou roli pro existenci nádoru hrají CSC také v úrovni rezistence vůči protinádorové terapii.

V rámci nádoru zároveň rozeznáváme populaci rychle a pomalu proliferujících nádorových buněk – tzv. proliferativní heterogenitu. Pomalu proliferující buňky jsou velmi rezistentní populací, která dokáže zprostředkovat kromě silné chemorezistence také recidivu onemocnění. Jak se ale tato heterogenita vytváří *in vivo*, není ještě zcela jasné (Dey-Guha et al., 2015).

## **5 INTERAKCE MSC S NÁDOROVÝMI BUŇKAMI A MIKROSPRSTŘEDÍM NÁDORU**

### **5.1 Role endogenních MSC v nádorové tkáni**

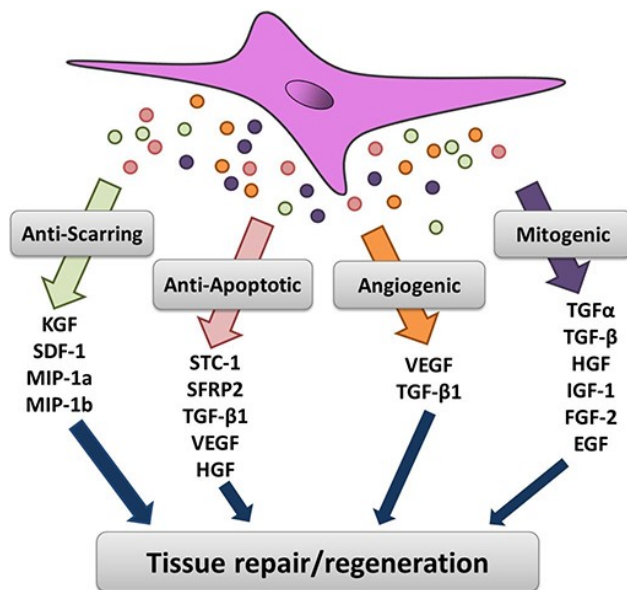
Již dříve bylo ukázáno, že MSC přirozeně se vyskytující v organismu (tj. endogenní) disponují schopností cíleně migrovat do míst zánětu nebo lokálního poškození na základě zánětlivé chemoatrakce, kde napomáhají k utváření reparativního a regenerativního mikroprostředí (Caplan and Correa, 2011). Protože se nádorová tkáň fyziologicky chová jako „rány, které se nikdy nehojí“, tj. vytváří zánětlivé prostředí a působí růstovými faktory na své okolí, mají MSC velký sklon migrovat k této tkáni (Obr. 4). Kromě primárních nádorů, mají MSC schopnost migrovat také k metastatickým ložiskům. Tuto vlastnost MSC označujeme jako tzv. nádorový tropismus (Cao et al., 2018; Kidd et al., 2009).



**Obrázek 4 - Faktory zodpovědné za tropismus MSC - migraci MSC do míst nádoru.** Základní fibroblastový růstový faktor (bFGF), růstový faktor odvozený z hepatomu (HDGF), monocytový chemotaktický protein – 2 (MCP-2), interleukin 6 (IL-6), aktivátor plasminogenu typu urokinázy (uPA), faktor 1 odvozený ze stromálních buněk (SDF-1), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) jsou příklady faktorů, které jsou zodpovědné za migraci MSC k nádorovým xenotransplantátům. Převzato z (Lee and Hong, 2017)

Charakteristickým rysem MSC v interakci s nádory jsou trofické a imunomodulační vlastnosti prokázané i v *in vivo* podmínkách. Tyto vlastnosti jsou zprostředkovány sekrecí bioaktivních molekul (cytokinů, růstových faktorů), kterými mohou působit jak parakrinně na své okolí, tak autokrinně (Caplan and Dennis, 2006).

Příklad sekretovaných faktorů MSC, tzv. sekretom MSC, je znázorněn na Obr. 5. (Ramaswamy et al., 2016).



**Obrázek 5 - Sekretom MSC.** Parakrinní faktory sekretované MSC, které hrají roli v potlačení tvorby jizev, potlačení apoptózy, stimulaci angiogeneze a stimulaci mitogeneze. Růstový faktor keratinocytů (KGF), faktor 1 odvozený ze stromálních buněk (SDF-1), makrofágový zánětlivý protein (MIP), Stanniocalcin-1 (STC-1), sekretovaný frizzled-příbuzný protein 2 (SFRP2), transformující růstový faktor (TGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), hepacytární růstový faktor (HGF), inzulinový růstový faktor (IGF), fibroblastový růstový faktor (FGF) a epidermální růstový faktor (EGF). Převzato z (Ramaswamy et al., 2016)

Mezi trofické vlastnosti MSC mj. patří i schopnost lokálního potlačení imunitního systému, antifibrotický a antiapoptotický účinek, zvýšení angiogeneze, schopnost stimulace mitózy a diferenciace reparativních nebo tkáňově specifických kmenových buněk (Caplan and Dennis, 2006).

Komunikace mezi MSC a nádorovými buňkami může být zprostředkována dvěma způsoby, přímým a nepřímým kontaktem. Přímým kontaktem komunikace probíhá pomocí tzv. mezerových spojů (gap junction) či prostřednictvím adhezivních molekul na povrchu buněk (Matuskova et al., 2010; Nair-Gupta et al., 2020). Nepřímým kontaktem probíhá komunikace, pomocí sekrece rozpustných faktorů (např. cytokiny, chemokiny, růstové faktory, metabolity, proteázy atd.) nebo působením extracelulárních váčků (exosomy, mikrovesikuly) obsahujících např. proteiny, RNA nebo microRNA, které mohou regulovat intracelulární signalizaci v cílových buňkách.

Pochopení těchto interakcí mezi MSC a rakovinnými buňkami a další studium MSC je proto naprosto zásadní vzhledem k jejich terapeutickému potenciálu při použití v protinádorových terapiích a zároveň ne zcela jednoznačnému působení na nádorové buňky.

## 5.2 Možnosti studia buněčných interakcí

Jedním z možných nástrojů, jak studovat chování buněk a jejich interakci s jinými buněčnými typy v organismu je metoda kokultivace v *in vitro* podmínkách. Pomocí kokultivace dochází k eliminaci dalších interakcí, které běžně probíhají v rámci přirozeného prostředí organismu, což přináší jistá omezení nebo změny v chování uměle kokultivovaných buněk oproti chování buněk v přirozených *in vivo* podmínkách. Přesto nám možnost kokultivace nabízí perspektivní model pro studium a popis mechanismů, které mohou zúčastněné buňky využívat v mezibuněčné komunikaci a interakci.

Další způsob jakým lze při výzkumu docílit přirozených podmínek nebo se jim co nejvíce přiblížit, je např. využití zvířecích modelů (*in vivo*). Oproti *in vitro* kokultivaci nabízí tato možnost sledování buněk v jejich přirozeném prostředí, na druhou stranu je nutné poznamenat, že vlastnosti

mikroprostředí jednotlivých organismů se mohou velmi lišit napříč živočišnou říší (mohou být vysoce variabilní jak mezi různými druhy živočichů, tak i mezi sledovanými jedinci daného druhu) a tak nemusí být ani tyto studie a jejich výsledky vždy průkazné či přenositelné pro využití v humánní medicíně. V následujících podkapitolách budou tedy na konkrétních příkladech demonstrovány protinádorové i pronádorové účinky MSC studované jak v *in vitro*, tak i v *in vivo* podmínkách.

### 5.3 Příklady potlačení rakovinného bujení působením MSC

#### 5.3.1 Zastavení buněčného cyklu nádorových buněk

Zastavení buněčného cyklu nádorových buněk různého původu ve fázi G0/G1 v přítomnosti MSC bylo ukázáno na několika nezávislých studiích.

Ramasamy a kol. ve své studii ukázal, že BM-MSC mají schopnost zamezovat průchodu nádorových buněk buněčným cyklem zastavením těchto buněk v G0/G1 fázi, pomocí mechanismu snížení hladiny cyklinu D2. Tento jev byl pozorován v *in vitro* podmínkách u nádorových buněk hematopoetického i nehematopoetického původu. Ramasamy a kol. však zároveň ukázal, že pokud jsou MSC v *in vivo* podmínkách, vykazují zcela opačné schopnosti tedy podporují rozvoj nádoru (Ramasamy et al., 2007).

Zamezení průchodu buněčným cyklem bylo pozorováno i při kokultivaci BM-MSC s buňkami chronické myeloidní leukémie (CML), zde byl zaznamenán signifikantní nárůst CML buněk v G0/G1 fázi buněčného cyklu a zvýšený výskyt apoptózy (Fathi et al., 2019).

Zastavení buněčného cyklu v G0/G1 fázi bylo dále pozorováno např. u buněk multifonního glioblastomu působením exogenní syntetické miRNA – 4731 zprostředkované transdukcí do AD-MSC pomocí lentiviru (Allahverdi et al., 2020).

#### 5.3.2 Inhibice vaskularizace nádoru

Přesto, že je podpora angiogeneze jednou z hlavních vlastností MSC v *in vivo* prostředí, ukazuje se, že za určitých podmínek může jejich vlivem docházet k inhibici vaskularizace.

Ve studii Otsu a kol. provedené na krysích BM-MSC bylo ukázáno, že MSC mohou při interakci s EC, při lokálním injekčním podání ve vyšších koncentracích (EC:MSC - 1:1 a 3:1) přímo do melanomu, působit cytotoxicky vůči EC. Po podání MSC došlo k jejich migraci směrem ke kapilárám odvozeným od EC, následné inkorporaci MSC do těchto kapilár a vytvoření

mezerových spojů (gap junction) s EC závislých na konexinu 43 (Cx43) a produkci reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) prostřednictvím MSC. Vlivem tvorby spojů a produkce ROS došlo k destrukci kapilár (prokázanou zvýšením exprese indikátoru apoptózy – aktivované kaspázy-3 v kapilárách) a tedy inhibici vaskularizace nádoru a snížení jeho růstu. Tato studie tedy poskytuje důkaz o cytotoxickém chování MSC buněk, které závisí na dávce MSC jak v kultuře, tak i v *in vivo* modelu (Otsu et al., 2009).

Jak ukazuje studie Zheng a kol., v zacílení protinádorové terapie na vaskularizaci nádorů se mohou uplatňovat také tzv. manipulované MSC. V této studii byly využity lidské MSC odvozené z placenty (hpMSC, human placenta-derived MSC), které byly prostřednictvím adenovirové transdukce upraveny pro produkci endostatínu, který je široce využíván v nádorových terapiích s cílem potlačit angiogenezi. U takto transdukovaných hpMSC byl pozorován nádorový tropismus *in vitro* i *in vivo* a tyto MSC úspěšně inhibovaly buněčnou proliferaci a snižovaly hustotu cév v nádorových tkáních (Zheng et al., 2012).

### 5.3.3 Potlačení signální kaskády Wnt

K potlačení růstu nádorových buněk může docházet také vlivem působení rozpustných faktorů vylučovaných MSC. Ve studii Ma a kol. bylo ukázáno, že kultivace gliomových buněk s kondiciovaným médiem (CM), obsahujícím sekreční produkty lidských MSC odvozených z pupeční šňůry (hUC-MSC, human umbilical cord-derived MSC), inhibuje proliferaci gliomových buněk a způsobuje pozastavení jejich buněčného cyklu. Inhibice proliferace pozitivně korelovala s koncentrací přidaného média, což ukazuje závislost inhibičního efektu MSC na koncentraci rozpustných faktorů v CM. Faktorem zodpovědným za inhibiční efekt byl označen protein dickkopf-1 (DKK-1), který je jedním z nejdůležitějších inhibitorů kanonické Wnt /  $\beta$ -katenin signalizační kaskády (Ma et al., 2014).

Dalším faktorem zodpovědným za potlačení signální kaskády Wnt /  $\beta$ -katenin může být hepatocytární jaderný faktor 4a (HNF4 $\alpha$ ), který je dominantním transkripčním regulátorem diferenciaci hepatocytů a hepatocelulární karcinogeneze. Dle studie Wu a kol., zvýšení exprese HNF4 $\alpha$  v buňkách hepatocelulárního karcinomu zprostředkované kultivací s CM odvozeným od lentivirem transdukovaných hUC-MSC, může potlačovat proliferaci a metastatický potenciál buněk karcinomu. Navíc zde byla detekována nižší genová exprese matrixových metaloproteináz MMP-2 a MMP-9 (matrix metalloproteinases),  $\beta$ -kateninu, cyklinu D1 a c-Myc, které také

souvisejí s Wnt /  $\beta$ -katenin signalizační kaskádou (Wu et al., 2016).

#### 5.3.4 Potlačení proliferace, migrace a indukce apoptózy nádorových buněk

Dalším možným nástrojem, který může sehrát významnou roli v potlačení proliferace a migrace nádorových buněk různých typů rakoviny, jsou také extracelulární váčky (EV) sekretované MSC.

Příkladem je studie Li a kol., ve které byl sledován účinek EV odvozených od hUC-MSC na buňky karcinomu endometria (ECa). Pomocí lentivirové transfekce byly upraveny MSC k uvolňování EV bohatých na miR-302a (mikroRNA, malé nekodující RNA, které se podílejí na regulaci genové exprese), které hrají klíčovou roli v mezibuněčné komunikaci. Po kultivaci buněk ECa s EV bohatými na miR-302a byla zaznamenána významná inhibice proliferace a migrace buněk EC vlivem snížené exprese cyklinu D1 a utlumení signalizační dráhy Akt v buňkách ECa (Li et al., 2019).

Jak však ukazuje studie Del Fattore a kol. na buňkách multifonního glioblastomu (GBM) v podmínkách *in vitro*, EV mohou mít různé účinky v závislosti na tkáňovém původu MSC, ze kterých jsou EV odvozeny (zde konkrétně z kostní dřene (BM), pupeční šňůry (UC) a tukové tkáně (AD). Zatímco EV odvozené od hBM- a hUC-MSC významně snižovaly buněčnou proliferaci a indukovaly apoptózu GBM, EV odvozené od hAD-MSC buněčnou proliferaci zvyšovaly a na apoptózu GBM neměly žádný vliv (Del Fattore et al., 2015).

Odlišné účinky u MSC různého tkáňového původu, popisuje i studie Yang a kol. V této studii byla buněčná linie lidského gliomu kultivována s CM odvozeným od hUC-MSC a hAD-MSC. Studie ukázala, že CM mohou významně inhibovat růst a indukovat apoptózu lidské buněčné linie gliomů s tím, že CM odvozené od hUC-MSC indukuje apoptózu s větší účinností. Kultivace gliomových buněk s CM z obou typů MSC vedla k významně zvýšené expresi proapoptotických genů kaspázy-3 i kaspázy-9 a proteinů Bad, Bax, Bim, Bid a zároveň ke snížení exprese protiapoptotických proteinů Bcl-2, survivin a XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) (Yang et al., 2014).

Ve studii Clarke a kol, zabývající se MSC v souvislosti s potlačením migračního a invazivního potenciálu nádorových buněk bylo také ukázáno, že po kultivaci buněk karcinomu prsu s CM odvozeným od MSC může docházet k inhibici pohybu buněk karcinomu. Za tuto inhibici byly zřejmě zodpovědné TIMP-1 a TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase) – tkáňové inhibitory

MMP, které byly obsaženy v CM. Protože MMP umožňují nádorovým buňkám pomocí proteolýzy průnik přes bazální membránu a ECM do krevního oběhu a bývají přímo spojovány s metastatickým potenciálem nádorových buněk, sekrecí podtypů TIMP z rodiny inhibitorů proteáz tak může být invazi nádorových buněk zamezeno.

Jak však tato studie dále ukázala, MSC mají schopnost sekretovat jak MMP-2 tak zároveň TIMP-1 a TIMP-2. Tyto výsledky tedy přichází s jedním z možných vysvětlení, proč MSC mohou mít jak pronádorové tak i protinádorové účinky a že konečný účinek MSC na invazivitu nádorových buněk tedy může záviset na rovnováze sekrece mezi pro a protimetastatickými faktory (Clarke et al., 2015).

Zajímavým příkladem kombinovaného protinádorového účinku MSC je studie Yuan a kol. V této studii byl sledován účinek CM odvozeného od hUC-MSC v *in vitro* podmínkách na buňky hepatocelulárního karcinomu (HCC) – linie BEL7402 a buněčné linie lidské rakoviny plic – A549. Po kultivaci s CM byla u nádorových buněk obou linií inhibována jednak buněčná proliferace zastavením buněčného cyklu (přičemž u A549 došlo k zastavení ve fázi G0/G1, zatímco u buněk HCC BEL7402 došlo k zastavení v S fázi buněčného cyklu), dále byly inhibovány migrační schopnosti buněk a zároveň byla indukována apoptóza u obou typů buněk. Byla zde zaznamenána nižší exprese Bcl-2,  $\beta$ -kateninu a c-Myc, dohromady tedy výsledky ukazují na účast molekul buněčné apoptózy i signální dráhy Wnt na výsledných inhibičních účincích hUC-MSC na nádorové buňky A549 a BEL7402. Tato studie ukazuje, že se jednotlivé protinádorové účinky MSC velmi často kombinují a navzájem se ovlivňují a lze je tedy jen velmi obtížné kategorizovat. Ze studie dále vyplývá, že protinádorový účinek MSC může zároveň záviset na konkrétních typech nádorových buněk (Yuan et al., 2018).

### 5.3.5 MSC jako nosiče molekul s terapeutickým účinkem

Jak již bylo naznačeno v předchozích kapitolách, MSC mají potenciál stát se buněčnými nosiči pro dodávání terapeutických produktů běžně užívaných v protinádorových terapiích, protože mohou být relativně snadno izolovány, expandovány a geneticky manipulovány na *in vitro* úrovni. Výhodu oproti konvenčním terapiím a systémově podávaným léčivům poskytují MSC také díky nádorovému tropismu, tj. vlastnosti, která umožňuje přímou infiltraci MSC do nádorové tkáně a která eliminuje cytotoxický účinek terapeutik na ostatní tkáně v organismu. Příklady několika terapeutik a jejich účinku na různé typy nádorového bujení jsou znázorněny v tabulce níže (Tab.2).



Terapeutikum	Typ MSC	Nádorový model	Účinek na nádorové buňky	Předpokládaný mechanismus	Reference
<b>IFN-β</b>	hUC-MSC	Karcinom prsu (MDA-MB-231 a Hs578T)	Inhibice růstu a indukce apoptózy <i>in vitro</i>	Inhibice růstu přímou kokultivací, indukce apoptózy buněk karcinomu aktivací kaspázy-3, -8 a -9 po kultivaci s CM	(Shen et al., 2016)
<b>IL-21</b>	hUC-MSC	Karcinom vaječníků (SKOV-3)	Inhibice růstu karcinomu vaječníků <i>in vivo</i> v myším modelu	Inhibice růstu snížením exprese β-kateninu a cyklinu-D1, stimulace vrozené imunitní odpovědi	(Zhang et al., 2014)
<b>IL-24</b>	hUC-MSC	Multiformní glioblastom (U251)	Inhibice růstu a indukce apoptózy <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	Utlumení signalizační dráhy Akt a snížení exprese Bcl-2	(Fan et al., 2020)
<b>PTEN</b>	hPD-MSC	Multiformní glioblastom (U251)	Inhibice růstu a indukce apoptózy <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	Negativní regulace signální dráhy PI3K/AKT/mTOR po kultivaci s CM	(Guo et al., 2016)
<b>TRAIL</b>	hAD-MSC	Duktální adenokarcinom pankreatu (BxPC-3 a MIA PaCa-2)	Indukce apoptózy a inhibice růstu a angiogeneze a snížení velikosti nádoru <i>in vivo</i> v myším modelu	Indukce apoptózy aktivací kaspázy-8	(Spano et al., 2019)
<b>NK4</b>	MSC nespecifikováno	Karcinom jater (MHCC-97H)	Inhibice proliferace, migrace a angiogeneze <i>in vitro</i> , inhibice růstu nádoru <i>in vivo</i>	Antagonický účinek NK4 vůči HGF, inhibice růstu a migrace potlačením úrovně fosforylace Erk1/2 kultivací s CM	(Cai et al., 2017)
<b>PEDF</b>	mBM-MSC	Kolorektální karcinom (CT26)	Inhibice angiogeneze a tvorby metastáz, indukce apoptózy <i>in vivo</i> v myším modelu	Inhibice exprese VEGF-A, obnova poměru VEGF-A/sFLT-1	(Yang et al., 2016)

**Tabulka 2 - Vybrané příklady terapeutických činidel dodávaných pomocí MSC a jejich účinek na nádorové modely různého druhu.** Interferon (IFN), interleukin (IL), homolog fosfatázy a tenzinu (PTEN), apoptózu indukující ligand příbuzný faktoru nekrotizujícímu nádory (TRAIL), faktor odvozený z pigmentového epitelu (PEDF), lidské MSC odvozené z pupečnickové šňůry (hUC-MSC), lidské MSC odvozené z pankreatické duktální tkáně (hPD-MSC), lidské MSC odvozené z tukové tkáně (hAD-MSC), myší MSC odvozené z kostní dřeně (mBM-MSC), kondiciované médium (CM), hepacytární růstový faktor (HGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), solubilní fms podobná tyrosinkináza (sFLT-1).

## 5.4 Příklady podpory rakovinného bujení působením MSC

### 5.4.1 Podpora proliferace a potlačení apoptózy nádorových buněk

Zvýšení proliferace buněk kolorektálního karcinomu (CRC) v souvislosti s inhibicí apoptózy a zásahem do buněčného cyklu bylo demonstrováno ve studii Wu a kol. V této studii byla po kokultivaci buněk CRC s CM odvozeným z hBM-MSC pozorována významně nižší rychlost apoptózy buněk CRC a vyšší podíl buněk CRC v S-fázi buněčného cyklu, což naznačuje, že toto CM mělo proliferativní účinek na CRC. Byla pozorována nižší exprese proapoptotických proteinů (Bax, p53) a zvýšená exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2, což celkově podporuje antiapoptotický účinek MSC na buňky CRC (Wu et al., 2016).

Naderi a kol. ve své studii ukazuje, že rezidentní BM-MSC podporují vývoj akutní lymfoblastické leukémie z prekursorů B-buněk (BCP-ALL) pomocí produkce prostaglandinu E2 (PGE2) v *in vitro* podmínkách. PGE2 z BM-MSC stimuluje BCL-ALL k produkci druhého posla – cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který má prostřednictvím aktivace protein kinázy A (PKA) schopnost potlačit apoptózu indukovanou akumulací p53, ke které dochází vlivem poškození DNA v buňce (kap. 4.1.4). Výsledkem zamezení akumulace p53 je zvýšené přežití BCP-ALL. Zároveň bylo ukázáno, že po inhibici syntézy PGE2, nebo aktivity PKA dochází k reverzibilní indukci apoptózy BCP-ALL, což naznačuje možný terapeutický cíl v protinádorové terapii (Naderi et al., 2015).

### 5.4.2 Podpora vaskularizace nádoru

MCS mohou podporovat rozvoj nádoru také jeho vaskularizací a to dvěma způsoby, buď přímo nebo nepřímo. Přímo probíhá podpora vaskularizace diferenciací MSC do buněk endoteliální linie, nepřímo pak probíhá prostřednictvím sekrece proangiogenních růstových faktorů.

Diferenciace MSC do endoteliálních buněk v *in vitro* podmínkách byla demonstrována ve studiích Oswald a kol. a Wang a kol. V obou těchto studiích byly použity hBM-MSC, které se vlivem kultivace v přítomnosti VEGF měly schopnost diferencovat do buněk s fenotypovými i funkčními vlastnostmi EC. Kultivace v přítomnosti VEGF vedla také ke zvýšení exprese endotelových specifických markerů (např. KDR, FLT-1, vWF, VE-kadherinu a VCAM-1), což naznačuje vznik fenotypu EC. Tato pozorování také naznačují, že MSC mají schopnost se

diferencovat do buněk endoteliální linie a podpořit tak angiogenezi svým přímým zapojením (Oswald et al., 2004; Wang et al., 2018).

Ve studii provedené Liu a kol. na myším *in vivo* modelu kolorektálního karcinomu bylo ukázáno, že MSC odvozené z myší kostní dřeně mohou podpořit růst nádorových buněk také nepřímo, působením proangiogenních faktorů. Tento účinek byl navíc umocněn, pokud byly MSC předem stimulovány zánětlivými cytokiny IFN-  $\gamma$  a TNF-  $\alpha$ . Studie navíc ukázala, že MSC stimulované oběma zánětlivými cytokiny mají schopnost podpořit angiogenezi karcinomu *in vivo* v mnohem větší míře než neošetřené MSC nebo MSC předem stimulované buď samotným IFN-  $\gamma$  nebo TNF-  $\alpha$ . Výsledky naznačují, že stimulované MSC v mikroprostředí nádoru exprimují vyšší hladiny VEGF prostřednictvím mechanismu závislého na HIF, což nakonec vede k růstu karcinomu tlustého střeva v myším modelu (Liu et al., 2011)

Kromě VEGF může indukovat angiogenezi také např. IL-8, jak je ukázáno ve studii Wang a kol. Sekretovat chemokin IL-8 mají schopnost jak hBM-MSC tak zároveň i buňky kolorektálního karcinomu (CRC). Bylo však zjištěno, že v kokultuře byla exprese IL-8 prostřednictvím hBM-MSC výrazně vyšší než v buňkách CRC. Vlivem působení sekretovaného IL-8 dochází kromě indukce angiogeneze také ke stimulaci růstu CRC v *in vitro* i *in vivo* podmínkách (Wang et al., 2015).

V modelu hepatocelulárního karcinomu (HCC) může podporovat vznik nových cév také TGF- $\beta$ 1 sekretovaný prostřednictvím hBM-MSC, jak je ukázáno ve studii Li a kol. Po injekci hBM-MSC do myšího modelu s HCC, byla pozorována zvýšená mikrovaskulární denzita oproti kontrole (bez hBM-MSC). Exprese VEGF se v závislosti na přítomnosti MSC nijak nelišila, zatímco byla zvýšena exprese TGF $\beta$ 1 mRNA. Výsledky této studie tak naznačují, že MSC mohou být schopny podpořit angiogenezi částečně zapojením TGF $\beta$ 1 (Li et al., 2016).

#### 5.4.3 Imunomodulační účinek MSC

MSC mají schopnost modulovat imunitní odpověď organismu. Potlačení imunitní odpovědi pomocí MSC může usnadnit remodelaci a opravu tkáně při poranění organismu, zároveň ale může vést k iniciaci nádoru, nebo podpoře jeho rozvoje. MSC modulují jak komponenty vrozené imunity (NK buňky, dendritické buňky), tak složky adaptivní imunity (B- a T- lymfocyty) a mohou tak svým přičiněním narušit přirozenou funkci buněk imunitního systému v protinádorové odpovědi.

Ve studii Galland a kol. byl srovnán imunomodulační účinek MSC odvozených z nádorového mikrostředí skvamózního karcinomu plic (T-MSC, tumor-derived MSC) a MSC odvozených ze sousední nenádorové tkáně (N-MSC, adjacent non-cancerous tissue-derived MSC) na NK (natural killer cells) buňky. Bylo zjištěno, že T-MSC vykazují větší imunosupresivní potenciál než N-MSC a více tak ovlivňují funkci a fenotyp NK buněk, potlačením schopnosti NK buněk produkovat IFN- $\gamma$ . Vliv obou typů MSC na NK buňky byl studován v přímé (dochází ke kontaktu buněk) i nepřímé (buňky odděleny membránou) kokultuře. Významnější vliv na imunosupresi NK hrála v tomto případě přímá kokultivace. Jako modulátory účastníci se inhibice NK buněk byly identifikovány IL-6 a PGE2 sekretované MSC (Galland et al., 2017).

Kromě IL-6 a PGE2 může inhibovat cytotoxickou a efektorovou funkci NK buněk také např. IDO (indolamin 2,3-dioxygenáza), jak bylo dokumentováno ve studii Spaggiari a kol. (Spaggiari et al., 2008)

MSC mohou také inhibovat účinek dendritických buněk (DC), jak je demonstrováno ve studii Zhang a kol. Inhibice funkce a maturace DC pomocí myších BM-MSC ve společné kokultuře byla způsobena sekrecí galektinu-1 prostřednictvím BM-MSC. Dále bylo zjištěno, že se inhibiční účinek na DC buňky zvýšil s dobou kokultivace s BM-MSC a se zvýšením poměru BM-MSC:DC v kokultivaci (Zhang et al., 2017).

Odpověď adaptivní imunity může být vlivem MSC také modulována, jak prezentuje například studie Laing a kol. V této studii byl ukázán inhibiční vliv MSC izolovaných ze zubní pulpy na funkci T-lymfocytů *in vitro*, prostřednictvím řady mechanismů, zahrnujících například působení IDO (Laing et al., 2019).

Zároveň, jak bylo ukázáno ve studii Luz-Crawford a kol., mají MSC schopnost inhibovat diferenciaci B-lymfocytů mechanismem souvisejícím s expresí antagonisty receptoru interleukinu-1 a zároveň polarizovat makrofágy k fenotypu M2. Makrofágy M2 hrají mj. významnou roli při rozvoji nádorových onemocnění např. sekrecí imunosupresivních cytokinů, které inhibují protinádorovou odpověď dalších složek imunitního systému (Luz-Crawford et al., 2016).

Ve studii Waterman a kol. bylo také demonstrováno, že MSC exprimují na svém povrchu specifické toll-like receptory (TLR), jejichž stimulace může ovlivnit imunitní modulační odpověď MSC. Pomocí TLR buňky rozeznávají signály asociované s nebezpečím a jejich stimulace tak vede k aktivaci vrozené i adaptivní složky imunitního systému. Po stimulaci specifických TLR na

povrchu MSC dochází k polarizaci MSC na dva fenotypy a to MSC1 a MSC2. MSC1 je prozánětlivým fenotypem, který vzniká v reakci na stimulaci TLR4. Po stimulaci TLR3 vzniká naproti tomu imunosupresivní fenotyp MSC2 (Waterman et al., 2010). Polarizace MSC může mít významný vliv na nádorové bujení, protože zatímco MSC1 mohou růst nádorů potlačovat, MSC2 podporují růst, rozvoj a metastatickou aktivitu nádorů (Waterman et al., 2012).

#### 5.4.4 Podpora invazivity a tvorby metastáz

Schopnost MSC indukovat EMT v buňkách CRC, který je třetím nejčastějším nádorovým onemocněním a jednou z významných příčin úmrtí na celém světě (Jemal et al., 2011), ve své práci ukázal Takigawa a kol. Zvýšená proliferační a migrační schopnost buněk CRC byla pozorována pouze v případě přímé kokultivace CRC s MSC, což naznačuje vliv přímého kontaktu mezi buňkami. Dále bylo zjištěno, že po přímé kokultivaci dochází u buněk CRC ke zvýšení exprese genů souvisejících s EMT, jako je například gen pro fibronectin (FN), SPARC a galektin 1. Zvýšená exprese těchto genů byla doložena qRT-PCR metodou (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction). Dále bylo v této práci dokumentováno, že zvýšení migračního potenciálu CRC může souviset s morfologickými změnami buněk CRC po styku s MSC, kdy vznikají buňky vřetenovitého tvaru. Kromě toho společná implantace MSC a buněk CRC zvýšila expresi FN v místech společného styku a zároveň došlo ke snížení exprese E–kadherinu na *in vivo* úrovni (Takigawa et al., 2017).

Změna morfologie po společné kokultivaci s MSC a snížení exprese E–kadherinu byla pozorována i v případě buněk karcinomu žaludku ve studii Xu a kol. Kromě toho byla vlivem kokultivace pozorována i zvýšená exprese dalších markerů specifických pro EMT a to vimentinu, N–kadherinu, Twist, Snail,  $\alpha$ -SMA a  $\beta$ -kateninu. V této studii byl opět prokázán vliv přímého kontaktu MSC a nádorových buněk a parakrinní signalizace na podporu invazivity a metastázování nádorových buněk (Xue et al., 2015).

#### 5.4.5 Inkorporace MSC do nádorového mikroprostředí

Jak bylo zmíněno v kapitole 4.2. MSC tvoří významnou součást nádorového mikroprostředí. Důležitým aspektem v působení MSC na nádorové buňky je interakce MSC s CSC.

Toto je demonstrováno například ve studii Hossain a kol., ve které byly užity hMSC vyizolované z mikroprostředí gliomu (GA-hMSC, glioma associated human MSC), které se fenotypově nijak nelišily od hBM-MSC běžně sloužících jako standard. Studie ukázala že GA-

hMSC mají schopnost zvýšit proliferaci a samovolnou obnovu gliomových kmenových buněk (GSC) v *in vitro* podmínkách a posilují tumorigenicitu a mezenchymální vlastnosti GSC v *in vivo* podmínkách. To potvrzuje funkční význam MSC v rámci nádorového mikroprostředí. Dále bylo ukázáno, že tyto účinky jsou zprostředkovány IL-6 sekretovaným GA-hMSC, který aktivuje kaskádu STAT3 v GCS. U buněk GCS dochází ke zvýšení exprese proteinů kmenových buněk (např. Sox2 a KLF4) po kultivaci s GA-hMSC, což naznačuje, že GA-hMSC mají potenciál zvyšovat kmenové vlastnosti GCS. Izolaci MSC z mikroprostředí gliomu bylo zároveň potvrzeno, že endogenní MSC (hBM-MSC nebo lokální tkáňové MSC) vykazují významný nádorový tropismus a následné začlenění do nádorového mikroprostředí (Hossain et al., 2015).

Další studie Li a kol. se zabývala rozdílem v regulačním účinku MSC odvozených z nádorové a nenádorové tkáně na buňky rakoviny žaludku (GC, gastric cancer). Zde byly testovány MSC odvozené z lidského nádoru žaludku (GC-hMSC, human gastric cancer-derived MSC), MSC odvozené ze sousedící nenádorové tkáně (GCN-hMSC, human gastric cancer adjacent non-cancerous tissue-derived MSC) a hBM-MSC. Studie ukázala, že přítomnost GC-hMSC v *in vitro* kokultivaci významně zvýšila proliferaci a migraci GC buněk, oproti kokultivaci GC s GCN-hMSC nebo hBM-MSC. Jak bylo dále ukázáno, tyto účinky byly zprostředkovány zvýšenou sekrecí IL-8 prostřednictvím GC-hMSC. Tyto výsledky tak poukazují na stěžejní roli MSC inkorporovaných do nádorového mikroprostředí v podpoře rozvoje nádoru (Li et al., 2015).

Vlivem působení lokálního nádorového mikroprostředí a nádorových buněk mohou MSC získat fenotyp fibroblastů asociovaných s nádorem tzv. „tumor – associated fibroblasts (TAF)“ nebo „cancer – associated fibroblasts (CAF)“, které tvoří významnou složku nádorového mikroprostředí (Kidd et al., 2012). Podle studie Barcellos de Souza a kol. dochází k indukci nádorového tropismu a inkorporaci MSC do nádorového mikroprostředí prostřednictvím sekrece TGF- $\beta$ 1 buňkami karcinomu prostaty a buňkami mikroprostředí. Po stimulaci MSC pomocí TGF- $\beta$ 1 sekretovaného buňkami karcinomu dále dochází k přeměně MSC na CAF, což zároveň dokládá zvýšení exprese markerů asociovaných s fenotypem CAF na MSC jako např.  $\alpha$ -SMA nebo FAP (fibroblast activation protein). Dále bylo zjištěno, že mezi buňkami karcinomu a MSC dochází k vzájemné komunikaci a stimulaci inkorporovaných MSC k další produkci TGF- $\beta$ 1, což usnadňuje inkorporaci dalších MSC a celkový rozvoj nádoru. Tento jev byl však pozorován pouze u linie buněk karcinomu prostaty necitlivých na androgen (Barcellos-de-Souza et al., 2016).

#### 5.4.6 Ochrana nádorových buněk před léčivý

Jednou z nejzávažnějších komplikací v rámci protinádorových terapií je častý vznik rezistence nádorových buněk na chemoterapeutická léčiva, což je významnou překážkou pro účinnou terapii. Navzdory skutečnosti, že jsou nádorové buňky geneticky nestabilní a mohou tak získávat mutace udělující chemorezistentní fenotyp, je velmi pravděpodobné, že se do vzniku rezistence zapojují i buňky nádorového mikroprostředí vč. MSC. Ukazuje se, že MSC mohou poskytovat nádorovým buňkám rezistenci vůči léčivům pomocí několika různých mechanismů.

Příkladem mechanismu je interakce nádorových buněk s exosomy sekretovanými MSC. Jak ukazuje studie Ji a kol., exosomy odvozené od hUC-MSC mohou indukovat rezistenci buněk rakoviny žaludku na apoptózu způsobenou léčivem 5-fluorouracil. Zároveň byla zjištěna zvýšená exprese proteinů spojených s rezistencí vůči různým léčivům např. MRP (Multidrug Resistance Protein), LRP (Lung Resistance-related Protein), což také vedlo ke snížení citlivosti na chemoterapii (Ji et al., 2015). Jak zároveň naznačuje studie Zhou a kol., exosomy sekretované hUC-MSC, mohou potenciálně hrát roli v ochraně buněk také před cisplatinou indukovaným oxidativním stresem a apoptózou v *in vitro* i *in vivo* podmínkách a vyvolat tak rezistenci vůči tomuto léčivu (Zhou et al., 2013).

Ke vzniku rezistence může docházet i po kultivaci nádorových buněk s CM odvozeným od MSC. Ve studii Castells a kol. byly kultivovány buňky ovariálního karcinomu společně s CM odvozeným z hBM-MSC nebo lidských MSC asociovaných s karcinomem (CA-hMSC). Faktory sekretované hBM-MSC i CA-hMSC podpořily vznik chemorezistence buněk karcinomu na karboplatinu potlačením apoptózy karcinomových buněk. Antiapoptotický účinek CM byl zřejmě zprostředkován proteinem XIAP – specifickým inhibítozem funkce kaspázy-3 a -7 (Castells et al., 2013). Přestože se v této studii hovoří pouze o sekretovaných faktorech (ale nikoli přímo o exosomech), nedá se zároveň vyloučit vliv exosomů, které mohou být v CM také přítomny.

## 6 KRITICKÉ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ÚČINEK MSC

Různorodost a nekonzistentnost výsledků studií zaměřených na působení MSC na buňky nádorového bujení a jejich dvojitý efekt, lze částečně odůvodnit celou řadou faktorů.

Mezi nejvýznamnější kritické faktory patří heterogenita MSC. Jak již bylo naznačeno v kap. 3.3., MSC vykazují velmi různorodé vlastnosti v závislosti na jejich tkáňovém původu, což se

může promítnout do jejich účinku v interakci s nádorovými buňkami, jak bylo ukázáno v několika nezávislých studiích (Del Fattore et al., 2015; Pendleton et al., 2013; Yang et al., 2014) atd. Přestože lze mezi jednotlivými tkáňově specifickými „subpopulacemi“ MSC nalézt značné rozdíly, definování MSC stále vychází pouze ze základních kritérií (Dominici et al., 2006), které tuto tkáňovou heterogenitu do jisté míry zanedbávají a které nebyly do dnešního dne výrazně aktualizovány. Tato kritéria jsou zároveň definována pro buňky v *in vitro* podmínkách, což může být problematické pro studium endogenních MSC a jejich vlivu na nádorové bujení v *in vivo* a *in situ* podmínkách.

Kromě tkáňového původu může hrát roli v účinku MSC také různorodost mezi jednotlivými dárci například vlivem věku (dospělé a fetální MSC), nebo jejich imunologického stavu.

Co se týká izolace MSC, ukazuje se, že MSC získané z mikroprostředí nádoru mohou působit na rozvoj nádorové tkáně velmi odlišným způsobem než MSC izolované ze zdravých tkání (Li et al., 2015). K různorodosti účinku MSC používaných ve výzkumu navíc může přispívat také technika izolace (např. adherence k plastu, centrifugace v gradientu Percoll, atd.) nebo kultivace ve specifickém médiu. Významným faktorem je proto samotný fakt, že pro izolaci, kultivaci a následnou expanzi MSC dodnes nebyl zaveden žádný univerzální postup.

Častým jevem, se kterým se lze v celé řadě studií setkat, je používání MSC z určitého rozmezí pasáží (např. 3 – 8 pasáž) (Yuan et al., 2018), kdy se toto rozmezí v různých studiích liší. Jak však bylo pozorováno ve studii provedené Kozlowka a kol., s přibývajícím počtem pasáží mění kultura MSC svoje vlastnosti a může tak vykazovat rozdíly v konečném terapeutickém účinku (Kozłowska et al., 2019). Mnohem vhodnější je tedy použití MSC z konkrétní pasáže.

Jedním z nedůležitějších faktorů je faktor prostředí, ve kterém dochází k interakci a následnému účinku MSC na nádorové buňky. Zatímco v *in vitro* podmínkách je účinek MSC oddělen od dalšího kontextu mezibuněčných interakcí, v *in vivo* podmínkách působí celá řada faktorů, které mohou zasahovat a dále modifikovat působení MSC na nádorové buňky, jak je shrnuto v kap. 5.2. Je důležité si uvědomit, že k účinku, který je pozorován v podmínkách *in vitro*, tak nemusí docházet také v *in vivo* podmínkách (Ramasamy et al., 2007).

Další významnou roli ve výsledném účinku MSC na nádorové bujení hraje typ vzájemné interakce mezi MSC a nádorovými buňkami v *in vitro* i *in vivo* podmínkách, ke které může docházet buď přímým kontaktem nebo působením sekretovaných faktorů. Účinek tedy může přímo záviset na způsobu vzájemné interakce (Suzuki et al., 2011; Takigawa et al., 2017).



Role MSC v podpoře nebo potlačení nádoru je velmi závislá na tom, zda se jedná o buňky endogenního původu (rezidentní MSC), nebo jestli byly v rámci studie přidávány exogenně. V případě exogenního podání může v účinku figurovat způsob aplikace (např. intramuskulární, intravenózní, subkutánní injekce, atd.) a dále pak množství nebo poměr dodaných MSC, protože se ukazuje, že MSC mohou vykazovat na koncentraci závislou buněčnou cytotoxicitu (Otsu et al., 2009). Významným faktorem je mj. i to, jestli byly exogenní MSC injikovány samostatně do již vzniklého nádoru nebo společně s nádorovými buňkami (Suzuki et al., 2011).

Velmi problematickým faktorem v interakci MSC a nádorových buněk je také samotná heterogenita nádorových buněk, jelikož jsou nádorová onemocnění velmi rozsáhlou a různorodou skupinou chorob, které sdílejí pouze podobné základní rysy a charakteristiky (kap. 4.1.). Zároveň je důležité si uvědomit, že velká část protinádorových terapií cílí na poškození DNA nádorových buněk. V populaci ale existuje nezanedbatelná variabilita co se týče genetického polymorfismu, zahrnujícího geny zodpovědné za opravné mechanismy (Shadrina et al., 2016). Tato variabilita tak může být pravděpodobně také zodpovědná za variabilitu v terapeutické odpovědi.

V neposlední řadě hraje v konečném výsledku interakce MSC a nádorových buněk roli také imunologický stav a to jak experimentálních zvířat tak pacientů.

## 7 ZÁVĚR

Četnost výskytu nádorových onemocnění se za poslední desetiletí výrazně zvyšuje, společně s množstvím rizikových faktorů, které se mohou na vzniku této skupiny onemocnění podílet. Přesto, že se každým rokem stále zlepšují léčebné postupy, které mohou buď nádorové onemocnění zcela vyléčit, nebo alespoň prodloužit délku a zlepšit kvalitu života pacientů, patří tato skupina onemocnění stále k jedné z nejčastějších příčin úmrtí.

Nádorová onemocnění jsou v současnosti stále léčena převážně tradičními terapiemi, které zahrnují např. chemoterapii, radioterapii, chirurgickou resekci, atd., případně jejich kombinaci. Tyto konvenční terapie však mají svá omezení a postrádají specifitu pro cílení pouze na nádorové buňky, což vyvolává řadu nežádoucích účinků na ostatní buňky a tkáně v organismu. Proto je v dnešní době velkou výzvou hledání nových způsobů a nástrojů, jak se s nádorovými onemocněními co nejúčinněji a zároveň, pro pacienta co nejšetrněji vypořádat.

Jako velmi perspektivní nástroj se v posledních letech zdají být MSC. MSC jsou buňky schopné samoobnovy, které lze izolovat téměř ze všech vaskularizovaných tkání v organismu a které vykazují multipotentní charakter *in vitro*. Pro své unikátní vlastnosti jako jsou sekrece trofických a imunomodulačních faktorů, cílená migrace do zánětlivého nádorového mikroprostředí a dále pak i možnost genetických manipulací, mají silný potenciál pro využití v protinádorových terapiích. Tento potenciál je dále podpořen jejich poměrně snadnou dostupností a možností izolace, které nepodléhají etickým problémům, jako je tomu v případě ESC.

Jak však tato práce shrnuje na základě dostupných zdrojů, účinek MSC na nádorové bujení není vždy jednoznačný. MSC mohou nádorové bujení jak potlačovat, tak podporovat a výsledný efekt závisí na celé řadě faktorů, které jsou podrobně rozebrány v kap. 6.

Jelikož je dvojí úloha MSC v nádorové biologii obecně široce uznávána, je nezbytné, abychom přistupovali k buněčným terapiím založeným na MSC stále velmi obezřetně. Naprosto zásadní je také další studium a výzkum přizpůsobení MSC pro klinické použití, aby se zejména posílily protinádorové vlastnosti a eliminovaly se účinky MSC podporující rozvoj nádorového bujení a učinily tak z MSC bezpečný, dobře uchopitelný a dlouhodobě předvídatelný nástroj v boji proti nádorovým onemocněním.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Pozn.: Sekundární citace jsou označeny\*

- Abedin, M.J., Wang, D., McDonnell, M.A., Lehmann, U., Kelekar, A., 2007. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ.* 14, 500–510.
- Al Ghrbawy, N.M., Afify, R.A.A.M., Dyaa, N., El Sayed, A.A., 2016. Differentiation of Bone Marrow: Derived Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-like Cells. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 32, 276–283.
- Al-Fatlawi, Anees A., Al-Fatlawi, Atheer A., Irshad, M., Rahisuddin, Ahmad, A., 2015. Effect of parthenolide on growth and apoptosis regulatory genes of human cancer cell lines. *Pharm. Biol.* 53, 104–109.
- Allahverdi, A., Arefian, E., Soleimani, M., Ai, J., Nahanmoghaddam, N., Yousefi-Ahmadipour, A., Ebrahimi-Barough, S., 2020. MicroRNA-4731-5p delivered by AD-mesenchymal stem cells induces cell cycle arrest and apoptosis in glioblastoma. *J. Cell. Physiol.* n/a.
- Anghileri, E., Marconi, S., Pignatelli, A., Cifelli, P., Galié, M., Sbarbati, A., Krampera, M., Belluzzi, O., Bonetti, B., 2008. Neuronal Differentiation Potential of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 17, 909–916.
- Barcellos-de-Souza, P., Comito, G., Pons-Segura, C., Taddei, M.L., Gori, V., Becherucci, V., Bambi, F., Margheri, F., Laurenzana, A., Rosso, M.D., Chiarugi, P., 2016. Mesenchymal Stem Cells are Recruited and Activated into Carcinoma-Associated Fibroblasts by Prostate Cancer Microenvironment-Derived TGF- $\beta$ 1. *Stem Cells.* S 34, 2536–2547.
- Beier, J.P., Bitto, F.F., Lange, C., Klumpp, D., Arkudas, A., Bleiziffer, O., Boos, A.M., Horch, R.E., Kneser, U., 2011. Myogenic differentiation of mesenchymal stem cells co-cultured with primary myoblasts. *Cell Biol. Int.* 35, 397–406.
- Bensimon-Brito, A., Cardeira, J., Dionísio, G., Huysseune, A., Cancela, M.L., Witten, P.E., 2016. Revisiting in vivo staining with alizarin red S - a valuable approach to analyse zebrafish skeletal mineralization during development and regeneration. *BMC Dev. Biol.* 16, 2.
- Brand, A., Singer, K., Koehl, G.E., Kolitzus, M., Schoenhammer, G., Thiel, A., Matos, C., Bruss, C., Klobuch, S., Peter, K., Kastenberger, M., Bogdan, C., Schleicher, U., Mackensen, A., Ullrich, E., et al., 2016. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab.* 24, 657–671.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 394–424.
- Cai, C., Hou, L., Zhang, J., Zhao, D., Wang, Z., Hu, H., He, J., Guan, W., Ma, Y., 2017. The Inhibitory Effect of Mesenchymal Stem Cells with rAd-NK4 on Liver Cancer. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 183, 444–459.
- Cao, M., Mao, J., Duan, X., Lu, L., Zhang, F., Lin, B., Chen, M., Zheng, C., Zhang, X., Shen, J., 2018. In vivo tracking of the tropism of mesenchymal stem cells to malignant gliomas using reporter gene-based MR imaging. *Int. J. Cancer* 142, 1033–1046.
- Cao, Y., Li, H., Deb, S., Liu, J.-P., 2002. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene* 21, 3130–3138.
- Caplan, A.I., 2017a. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl. Med.* 6, 1445–1451.

- Caplan, A.I., 2017b. New MSC: MSCs as pericytes are Sentinels and gatekeepers. *J. Orthop. Res.* 35, 1151–1159.
- Caplan, A.I., 1991. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641–650.
- Caplan, A.I., Correa, D., 2011. The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell* 9, 11–15.
- \*Caplan, A.I., Dennis, J.E., 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* 98, 1076–1084.
- Cardwell, R.D., Dahlgren, L.A., Goldstein, A.S., 2014. Electrospun fibre diameter, not alignment, affects mesenchymal stem cell differentiation into the tendon/ligament lineage. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 8, 937–945.
- Castells, M., Milhas, D., Gandy, C., Thibault, B., Rafii, A., Delord, J.-P., Couderc, B., 2013. Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation. *Cell Death Dis.* 4, e887.
- Cha, Y., Han, M.-J., Cha, H.-J., Zoldan, J., Burkart, A., Jung, J.H., Jang, Y., Kim, C.-H., Jeong, H.-C., Kim, B.-G., Langer, R., Kahn, C.R., Guarente, L., Kim, K.-S., 2017. Metabolic control of primed human pluripotent stem cell fate and function by the miR-200c–SIRT2 axis. *Nat. Cell Biol.* 19, 445–456.
- Chang, C.-H., Qiu, J., O’Sullivan, D., Buck, M.D., Noguchi, T., Curtis, J.D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, M.M., van der Windt, G.J.W., Tonc, E., Schreiber, R.D., Pearce, E.J., Pearce, E.L., 2015. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* 162, 1229–1241.
- Chen, C., Liu, T.S., Zhao, S.C., Yang, W.Z., Chen, Z.P., Yan, Y., 2018. XIAP impairs mitochondrial function during apoptosis by regulating the Bcl-2 family in renal cell carcinoma. *Exp. Ther. Med.* 15, 4587–4593.
- Clarke, M.R., Imhoff, F.M., Baird, S.K., 2015. Mesenchymal stem cells inhibit breast cancer cell migration and invasion through secretion of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2. *Mol. Carcinog.* 54, 1214–1219.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.-N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B.M., Badyrak, S., et al., 2008. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* 3, 301–313.
- Del Fattore, A., Luciano, R., Saracino, R., Battafarano, G., Rizzo, C., Pascucci, L., Alessandri, G., Pessina, A., Perrotta, A., Fierabracci, A., Muraca, M., 2015. Differential effects of extracellular vesicles secreted by mesenchymal stem cells from different sources on glioblastoma cells. *Expert Opin. Biol. Ther.* 15, 495–504.
- Dey-Guha, I., Alves, C.P., Yeh, A.C., Salony, Sole, X., Darp, R., Ramaswamy, S., 2015. A Mechanism for Asymmetric Cell Division Resulting in Proliferative Asynchronicity. *Mol. Cancer Res.* 13, 223–230.
- Dinami, R., Buemi, V., Sestito, R., Zappone, A., Ciani, Y., Mano, M., Petti, E., Sacconi, A., Blandino, G., Giacca, M., Piazza, S., Benetti, R., Schoeftner, S., 2017. Epigenetic silencing of miR-296 and miR-512 ensures hTERT dependent apoptosis protection and telomere maintenance in basal-type breast cancer cells. *Oncotarget* 8, 95674–95691.
- \*Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E.M., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.

- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Hanahan, D., 2010. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- $\kappa$ B-Dependent Manner. *Cancer Cell* 17, 135–147.
- Fan, S., Gao, H., Ji, W., Zhu, F., Sun, L., Liu, Y., Zhang, S., Xu, Y., Yan, Y., Gao, Y., 2020. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal/stem cells expressing IL-24 induce apoptosis in gliomas. *J. Cell. Physiol.* 235, 1769–1779.
- Fathi, E., Farahzadi, R., Valipour, B., Sanaat, Z., 2019. Cytokines secreted from bone marrow derived mesenchymal stem cells promote apoptosis and change cell cycle distribution of K562 cell line as clinical agent in cell transplantation. *PLOS ONE* 14, e0215678.
- \*Fouad, Y.A., Aanei, C., 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* 7, 1016–1036.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., Lalykina, K.S., 1970. The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells. *Cell Prolif.* 3, 393–403.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., Kulagina, N.N., 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267–274.
- Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I., Frolova, G.P., 1968. Heterotopic Transplants Of Bone Marrow. *Transplantation* 6, 230–247.
- Galland, S., Vuille, J., Martin, P., Letovanec, I., Caignard, A., Fregni, G., Stamenkovic, I., 2017. Tumor-Derived Mesenchymal Stem Cells Use Distinct Mechanisms to Block the Activity of Natural Killer Cell Subsets. *Cell Rep.* 20, 2891–2905.
- Ge, P., Wang, W., Li, L., Zhang, G., Gao, Z., Tang, Z., Dang, X., Wu, Y., 2019. Profiles of immune cell infiltration and immune-related genes in the tumor microenvironment of colorectal cancer. *Biomed. Pharmacother.* 118, 109228.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., Shi, S., 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13625–13630.
- Guimarães-Camboa, N., Cattaneo, P., Sun, Y., Moore-Morris, T., Gu, Y., Dalton, N.D., Rockenstein, E., Masliah, E., Peterson, K.L., Stallcup, W.B., Chen, J., Evans, S.M., 2017. Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo. *Cell Stem Cell* 20, 345-359.e5.
- \*Guo, S., Deng, C.-X., 2018. Effect of Stromal Cells in Tumor Microenvironment on Metastasis Initiation. *Int. J. Biol. Sci.* 14, 2083–2093.
- Guo, X.R., Hu, Q.Y., Yuan, Y.H., Tang, X.J., Yang, Z.S., Zou, D.D., Bian, L.J., Dai, L.J., Li, D.S., 2016. PTEN-mRNA engineered mesenchymal stem cell-mediated cytotoxic effects on U251 glioma cells. *Oncol. Lett.* 11, 2733–2740.
- \*Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- \*Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hayflick, L., Moorhead, P., 1961. The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. *Exp. Cell Res.*
- \*Hima Bindu, A., Srilatha, B., 2011. Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *J. Stem Cell Res. Ther.* 01.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A., 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395.

- Hossain, A., Gumin, J., Gao, F., Figueroa, J., Shinojima, N., Takezaki, T., Priebe, W., Villarreal, D., Kang, S.-G., Joyce, C., Sulman, E., Wang, Q., Marini, F.C., Andreeff, M., Colman, H., Lang, F.F., 2015. Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Gliomas Increase Proliferation and Maintain Stemness of Glioma Stem Cells Through the IL-6/gp130/STAT3 pathway. *Stem Cells Dayt. Ohio* 33, 2400–2415.
- Hou, T., Xu, J., Wu, X., Xie, Z., Luo, F., Zhang, Z., Zeng, L., 2009. Umbilical cord Wharton's Jelly: a new potential cell source of mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* 15, 2325–2334.
- Huang, Y., Yuan, J., Righi, E., Kamoun, W.S., Ancukiewicz, M., Nezivar, J., Santosuosso, M., Martin, J.D., Martin, M.R., Vianello, F., Leblanc, P., Munn, L.L., Huang, P., Duda, D.G., et al., 2012. Vascular normalizing doses of antiangiogenic treatment reprogram the immunosuppressive tumor microenvironment and enhance immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 17561–17566.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011. Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 69–90.
- Ji, R., Zhang, B., Zhang, X., Xue, J., Yuan, X., Yan, Y., Wang, M., Zhu, W., Qian, H., Xu, W., 2015. Exosomes derived from human mesenchymal stem cells confer drug resistance in gastric cancer. *Cell Cycle* 14, 2473–2483.
- Kaiser, S., Hackanson, B., Follo, M., Mehlhorn, A., Geiger, K., Ihorst, G., Kapp, U., 2007. BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype. *Cytotherapy* 9, 439–450.
- Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J.L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., Battula, L., Weil, M., Andreeff, M., Marini, F.C., 2009. Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments using In Vivo Bioluminescence Imaging. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 2614–2623.
- Kidd, S., Spaeth, E., Watson, K., Burks, J., Lu, H., Klopp, A., Andreeff, M., Marini, F.C., 2012. Origins of the Tumor Microenvironment: Quantitative Assessment of Adipose-Derived and Bone Marrow-Derived Stroma. *PLoS ONE* 7.
- Koukourakis, M.I., Pitiakoudis, M., Giatromanolaki, A., Tsarouha, A., Polychronidis, A., Sivridis, E., Simopoulos, C., 2006. Oxygen and glucose consumption in gastrointestinal adenocarcinomas: Correlation with markers of hypoxia, acidity and anaerobic glycolysis. *Cancer Sci.* 97, 1056–1060.
- Kozłowska, U., Krawczyński, A., Futoma, K., Jurek, T., Rorat, M., Patrzalek, D., Klimczak, A., 2019. Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues. *World J. Stem Cells* 11, 347–374.
- \*Labi, V., Erlacher, M., 2015. How cell death shapes cancer. *Cell Death Dis.* 6, e1675.
- Laing, A.G., Fanelli, G., Ramirez-Valdez, A., Lechler, R.I., Lombardi, G., Sharpe, P.T., 2019. Mesenchymal stem cells inhibit T-cell function through conserved induction of cellular stress. *PLoS ONE* 14.
- \*Lee, H.-Y., Hong, I.-S., 2017. Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential. *Cancer Sci.* 108, 1939–1946.
- Li, G.-C., Zhang, H.-W., Zhao, Q.-C., Sun, L., Yang, J.-J., Hong, L., Feng, F., Cai, L., 2016. Mesenchymal stem cells promote tumor angiogenesis via the action of transforming growth factor  $\beta$ 1. *Oncol. Lett.* 11, 1089–1094.
- Li, W., Zhou, Y., Yang, J., Zhang, X., Zhang, H., Zhang, T., Zhao, S., Zheng, P., Huo, J., Wu, H., 2015. Gastric cancer-derived mesenchymal stem cells prompt gastric cancer progression through secretion of interleukin-8. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 34.

- Li, X., Liu, L.L., Yao, J.L., Wang, K., Ai, H., 2019. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Inhibit Endometrial Cancer Cell Proliferation and Migration through Delivery of Exogenous miR-302a. *Stem Cells Int.* 2019, 8108576.
- Liu, D.P., Song, H., Xu, Y., 2010. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene* 29, 949–956.
- \*Liu, X., Rui, T., Zhang, S., Ding, Z., 2019. Heterogeneity of MSC: Origin, Molecular Identities, and Functionality. *Stem Cells Int.* 2019.
- Liu, Y., Han, Z., Zhang, S., Jing, Y., Bu, X., Wang, C., Sun, K., Jiang, G., Zhao, X., Li, R., Gao, L., Zhao, Q., Wu, M., Wei, L., 2011. Effects of Inflammatory Factors on Mesenchymal Stem Cells and Their Role in the Promotion of Tumor Angiogenesis in Colon Cancer. *J. Biol. Chem.* 286, 25007–25015.
- Liu, Z., Li, Q., Li, K., Chen, L., Li, W., Hou, M., Liu, T., Yang, J., Lindvall, C., Björkholm, M., Jia, J., Xu, D., 2013. Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells. *Oncogene* 32, 4203–4213.
- Luz-Crawford, P., Djouad, F., Toupet, K., Bony, C., Franquesa, M., Hoogduijn, M.J., Jorgensen, C., Noël, D., 2016. Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation. *STEM CELLS* 34, 483–492.
- Ma, S., Liang, S., Jiao, H., Chi, L., Shi, X., Tian, Y., Yang, B., Guan, F., 2014. Human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit C6 glioma growth via secretion of dickkopf-1 (DKK1). *Mol. Cell. Biochem.* 385, 277–286.
- Ma, Y., Zhang, H., Xiong, C., Liu, Z., Xu, Q., Feng, J., Zhang, J., Wang, Z., Yan, X., 2018. CD146 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during TGF- $\beta$  signaling-induced epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Lett.* 430, 201–214.
- Matuskova, M., Hlubinova, K., Pastorakova, A., Hunakova, L., Altanerova, V., Altaner, C., Kucerova, L., 2010. HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells. *Cancer Lett.* 290, 58–67.
- \*Medzhitov, R., 2015. Bringing Warburg to lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 598.
- Naderi, E.H., Skah, S., Ugland, H., Myklebost, O., Sandnes, D.L., Torgersen, M.L., Josefsen, D., Ruud, E., Naderi, S., Blomhoff, H.K., 2015. Bone marrow stroma-derived PGE2 protects BCP-ALL cells from DNA damage-induced p53 accumulation and cell death. *Mol. Cancer* 14.
- Nair-Gupta, P., Rudnick, S.I., Luistro, L., Smith, M., McDaid, R., Li, Y., Pillarisetti, K., Joseph, J., Heidrich, B., Packman, K., Attar, R., Gaudet, F., 2020. Blockade of VLA4 sensitizes leukemic and myeloma tumor cells to CD3 redirection in the bone marrow microenvironment. *Blood Cancer J.* 10, 1–13.
- Ochi, M., 2013. Shinya Yamanaka's 2012 Nobel Prize and the radical change in orthopedic strategy thanks to his discovery of iPS cells. *Acta Orthop.* 84, 1–3.
- \*Oh, M., Nör, J., 2015. The Perivascular Niche and Self-Renewal of Stem Cells. *Front. Physiol.* 6.
- Oladipupo, S., Hu, S., Kovalski, J., Yao, J., Santeford, A., Sohn, R.E., Shohet, R., Maslov, K., Wang, L.V., Arbeit, J.M., 2011. VEGF is essential for hypoxia-inducible factor-mediated neovascularization but dispensable for endothelial sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13264–13269.
- Oswald, J., Boxberger, S., Jørgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhäuser, M., Werner, C., 2004. Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. *STEM CELLS* 22, 377–384.

- Otsu, K., Das, S., Houser, S.D., Quadri, S.K., Bhattacharya, S., Bhattacharya, J., 2009. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood* 113, 4197–4205.
- Pendleton, C., Li, Q., Chesler, D.A., Yuan, K., Guerrero-Cazares, H., Quinones-Hinojosa, A., 2013. Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue vs Bone Marrow: In Vitro Comparison of Their Tropism towards Gliomas. *PLoS ONE* 8.
- \*Piersma, S.J., 2011. Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Cervical Cancer Patients. *Cancer Microenviron.* 4, 361–375.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.
- Pritchard, C.C., Mateo, J., Walsh, M.F., De Sarkar, N., Abida, W., Beltran, H., Garofalo, A., Gulati, R., Carreira, S., Eeles, R., Elemento, O., Rubin, M.A., Robinson, D., et al. 2016. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 375, 443–453.
- Raimondo, S., Saieva, L., Corrado, C., Fontana, S., Flugy, A., Rizzo, A., De Leo, G., Alessandro, R., 2015. Chronic myeloid leukemia-derived exosomes promote tumor growth through an autocrine mechanism. *Cell Commun. Signal.* 13, 8.
- Ramasamy, R., Lam, E.W.-F., Soeiro, I., Tisato, V., Bonnet, D., Dazzi, F., 2007. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* 21, 304–310.
- \*Ramaswamy, Y., Lim, K.S., Zreiqat, H., Lu, Z., 2016. Stem Cells for Bone Regeneration: Role of Trophic Factors. *Adv. Tech. Bone Regen.*
- Raynaud, C.M., Maleki, M., Lis, R., Ahmed, B., Al-Azwani, I., Malek, J., Safadi, F.F., Rafii, A., 2012. Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation. *Stem Cells Int.* 2012, 658356.
- Red Brewer, M., Yun, C.-H., Lai, D., Lemmon, M.A., Eck, M.J., Pao, W., 2013. Mechanism for activation of mutated epidermal growth factor receptors in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E3595–E3604.
- Ripka, S., Neesse, A., Riedel, J., Bug, E., Aigner, A., Poulsom, R., Fulda, S., Neoptolemos, J., Greenhalf, W., Barth, P., Gress, T.M., Michl, P., 2010. CUX1: target of Akt signalling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer. *Gut* 59, 1101–1110.
- Rong, L., Li, R., Li, S., Luo, R., 2016. Immunosuppression of breast cancer cells mediated by transforming growth factor- $\beta$  in exosomes from cancer cells. *Oncol. Lett.* 11, 500–504.
- Roser, M., Ritchie, H., 2015. *Cancer. Our World Data.*
- Rotter, N., Oder, J., Schlenke, P., Lindner, U., Böhrnsen, F., Kramer, J., Rohwedel, J., Huss, R., Brandau, S., Wollenberg, B., Lang, S., 2008. Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev.* 17, 509–518.
- Scherberich, A., Di Maggio, N.D., McNagny, K.M., 2013. A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue. *World J. Stem Cells* 5, 1–8.
- Selvaggi, G., Novello, S., Torri, V., Leonardo, E., De Giulii, P., Borasio, P., Mossetti, C., Ardisson, F., Lausi, P., Scagliotti, G.V., 2004. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 15, 28–32.



- Shadrina, A.S., Ermolenko, N.A., Boyarskikh, U.A., Sinkina, T.V., Lazarev, A.F., Petrova, V.D., Filipenko, M.L., 2016. Polymorphisms in DNA repair genes and breast cancer risk in Russian population: a case-control study. *Clin. Exp. Med.* 16, 21–28.
- \*Shay, J.W., Wright, W.E., 2010. Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *Febs Lett.* 584, 3819–3825.
- Shen, C.-J., Chan, T.-F., Chen, C.-C., Hsu, Y.-C., Long, C.-Y., Lai, C.-S., 2016. Human umbilical cord matrix-derived stem cells expressing interferon- $\beta$  gene inhibit breast cancer cells via apoptosis. *Oncotarget* 7, 34172–34179.
- Shen, Z., Zhou, R., Liu, C., Wang, Y., Zhan, W., Shao, Z., Liu, J., Zhang, F., Xu, L., Zhou, X., Qi, L., Bo, F., Ding, Y., Zhao, L., 2017. MicroRNA-105 is involved in TNF- $\alpha$ -related tumor microenvironment enhanced colorectal cancer progression. *Cell Death Dis.* 8, 1–13.
- Shivakumar, S.B., Lee, H.-J., Son, Y.-B., Bharti, D., Ock, S.A., Lee, S.-L., Kang, Y.-H., Park, B.-W., Rho, G.-J., 2019. In vitro differentiation of single donor derived human dental mesenchymal stem cells into pancreatic  $\beta$  cell-like cells. *Biosci. Rep.* 39.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2019. Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* 69, 7–34.
- Smith, S.A., Newman, S.J., Coleman, M.P., Alex, C., 2018. Characterization of the histologic appearance of normal gill tissue using special staining techniques. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 30, 688–698.
- Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C., Moretta, L., 2008. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111, 1327–1333.
- Spano, C., Grisendi, G., Golinelli, G., Rossignoli, F., Prapa, M., Bestagno, M., Candini, O., Petrachi, T., Recchia, A., Miselli, F., Rovesti, G., Orsi, G., Maiorana, A., Manni, P., Veronesi, E., et al., 2019. Soluble TRAIL Armed Human MSC As Gene Therapy For Pancreatic Cancer. *Sci. Rep.* 9, 1788.
- \*Stein, C.J., Colditz, G.A., 2004. Modifiable risk factors for cancer. *Br. J. Cancer* 90, 299–303.
- Stewart, S.A., Hahn, W.C., O'Connor, B.F., Banner, E.N., Lundberg, A.S., Modha, P., Mizuno, H., Brooks, M.W., Fleming, M., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Weinberg, R.A., 2002. Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12606–12611.
- Suzuki, K., Sun, R., Origuchi, M., Kanehira, M., Takahata, T., Itoh, J., Umezawa, A., Kijima, H., Fukuda, S., Saijo, Y., 2011. Mesenchymal Stromal Cells Promote Tumor Growth through the Enhancement of Neovascularization. *Mol. Med.* 17, 579–587.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takigawa, H., Kitadai, Y., Shinagawa, K., Yuge, R., Higashi, Y., Tanaka, S., Yasui, W., Chayama, K., 2017. Mesenchymal Stem Cells Induce Epithelial to Mesenchymal Transition in Colon Cancer Cells through Direct Cell-to-Cell Contact. *Neoplasia N. Y.* N 19, 429–438.
- \*Tehrani, R.M., Verdi, J., Nouredini, M., Salehi, R., Salarinia, R., Mosalaei, M., Simonian, M., Alani, B., Ghiasi, M.R., Jaafari, M.R., Mirzaei, H.R., Mirzaei, H., 2018. Mesenchymal stem cells: A new platform for targeting suicide genes in cancer. *J. Cell. Physiol.* 233, 3831–3845.

- Thangavel, C., Boopathi, E., Liu, Y., Haber, A., Ertel, A., Bhardwaj, A., Addya, S., Williams, N., Ciment, S.J., Cotzia, P., Dean, J.L., Snook, A., McNair, C., Price, M., Hernandez, J.R., Zhao, S.G., Birbe, et al., 2017. RB Loss Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Res.* 77, 982–995.
- Varum, S., Rodrigues, A.S., Moura, M.B., Momcilovic, O., Easley, C.A., Ramalho-Santos, J., Van Houten, B., Schatten, G., 2011. Energy Metabolism in Human Pluripotent Stem Cells and Their Differentiated Counterparts. *PLoS ONE* 6.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., Ho, A.D., 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 33, 1402–1416.
- Wang, C., Li, Y., Yang, M., Zou, Y., Liu, H., Liang, Z., Yin, Y., Niu, G., Yan, Z., Zhang, B., 2018. Efficient Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Endothelial Cells in Vitro. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 55, 257–265.
- Wang, J., Wang, Y., Wang, S., Cai, J., Shi, J., Sui, X., Cao, Y., Huang, W., Chen, X., Cai, Z., Li, H., Bardeesi, A.S.A., Zhang, B., Liu, M., Song, W., Wang, M., Xiang, A.P., 2015. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted IL-8 promotes the angiogenesis and growth of colorectal cancer. *Oncotarget* 6, 42825–42837.
- Wang, Z., Yip, L.Y., Lee, J.H.J., Wu, Z., Chew, H.Y., Chong, P.K.W., Teo, C.C., Ang, H.Y.-K., Peh, K.L.E., Yuan, J., Ma, S., Choo, L.S.K., Basri, N., Jiang, X., Yu, Q., Hillmer, A.M., Lim, W.T., et al., 2019. Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells. *Nat. Med.* 25, 825–837.
- Warburg, O., 1956. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123, 309–314.
- Warburg, O., 1925. The Metabolism of Carcinoma Cells. *J. Cancer Res.* 9, 148–163.
- Waterman, R.S., Henkle, S.L., Betancourt, A.M., 2012. Mesenchymal Stem Cell 1 (MSC1)-Based Therapy Attenuates Tumor Growth Whereas MSC2-Treatment Promotes Tumor Growth and Metastasis. *PLoS ONE* 7.
- Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., Betancourt, A.M., 2010. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLOS ONE* 5, e10088.
- Wu, N., Zhang, Y.-L., Wang, H.-T., Li, D.-W., Dai, H.-J., Zhang, Q.-Q., Zhang, J., Ma, Y., Xia, Q., Bian, J.-M., Hang, H.-L., 2016. Overexpression of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in human mesenchymal stem cells suppresses hepatocellular carcinoma development through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway downregulation. *Cancer Biol. Ther.* 17, 558–565.
- Wu, X.B., Liu, Y., Wang, G.-H., Xu, X., Cai, Y., Wang, H.-Y., Li, Y.-Q., Meng, H.-F., Dai, F., Jin, J.-D., 2016. Mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through AMPK/mTOR-mediated NF- $\kappa$ B activation. *Sci. Rep.* 6.
- Xu, C., Xiao, G., Zhang, B., Wang, M., Wang, J., Liu, D., Zhang, J., Ren, H., Sun, X., 2018. CCAT1 stimulation of the symmetric division of NSCLC stem cells through activation of the Wnt signalling cascade. *Gene Ther.* 25, 4–12.
- Xue, Z., Wu, X., Chen, X., Liu, Y., Wang, X., Wu, K., Nie, Y., Fan, D., 2015. Mesenchymal Stem Cells Promote Epithelial to Mesenchymal Transition and Metastasis in Gastric Cancer Through Paracrine Cues and Close Physical Contact. *J. Cell. Biochem.* 116, 618–627.
- Yang, C., Lei, D., Ouyang, W., Ren, J., Li, H., Hu, J., Huang, S., 2014. Conditioned Media from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Efficiently Induced the Apoptosis and Differentiation in Human Glioma Cell Lines In Vitro. *BioMed Res. Int.*

- Yang, L., Zhang, Y., Cheng, L., Yue, D., Ma, J., Zhao, D., Hou, X., Xiang, R., Cheng, P., 2016. Mesenchymal Stem Cells Engineered to Secrete Pigment Epithelium-Derived Factor Inhibit Tumor Metastasis and the Formation of Malignant Ascites in a Murine Colorectal Peritoneal Carcinomatosis Model. *Hum. Gene Ther.* 27, 267–277.
- \*Yeung, K.T., Yang, J., 2017. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol. Oncol.* 11, 28–39.
- Yi, W., Xiao, E., Ding, R., Luo, P., Yang, Y., 2016. High expression of fibronectin is associated with poor prognosis, cell proliferation and malignancy via the NF- $\kappa$ B/p53-apoptosis signaling pathway in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 36, 3145–3153.
- Yin, Z., Guo, J., Wu, T., Chen, X., Xu, L., Lin, S., Sun, Y., Chan, K.-M., Ouyang, H., Li, G., 2016. Stepwise Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Augments Tendon-Like Tissue Formation and Defect Repair In Vivo. *Stem Cells Transl. Med.* 5, 1106–1116.
- Yuan, Y., Zhou, C., Chen, X., Tao, C., Cheng, H., Lu, X., 2018. Suppression of tumor cell proliferation and migration by human umbilical cord mesenchymal stem cells: A possible role for apoptosis and Wnt signaling. *Oncol. Lett.* 15, 8536–8544.
- Zhang, J.-M., Yadav, T., Ouyang, J., Lan, L., Zou, L., 2019. Alternative Lengthening of Telomeres through Two Distinct Break-Induced Replication Pathways. *Cell Rep.* 26, 955-968.e3.
- Zhang, Y., Ge, X., Guo, X.-J., Guan, S., Li, X., Gu, W., Xu, W., 2017. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Function of Dendritic Cells by Secreting Galectin-1. *BioMed Res. Int.* 2017.
- Zhang, Y., Wang, J., Ren, M., Li, M., Chen, D., Chen, J., Shi, F., Wang, X., Dou, J., 2014. Gene therapy of ovarian cancer using IL-21-secreting human umbilical cord mesenchymal stem cells in nude mice. *J. Ovarian Res.* 7, 8.
- Zheng, L., Zhang, D., Chen, X., Yang, L., Wei, Y., Zhao, X., 2012. Antitumor Activities of Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Expressing Endostatin on Ovarian Cancer. *PLoS ONE* 7.
- Zhou, Y., Xu, H., Xu, W., Wang, B., Wu, H., Tao, Y., Zhang, B., Wang, M., Mao, F., Yan, Y., Gao, S., Gu, H., Zhu, W., Qian, H., 2013. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* 4, 34.